





9. 705-716 (1980), Cell, 42, 921-928 (1986)).  
【0003】NF- $\kappa$ Bは、RelAファミリーに属する複数の分子のヘテロダイマーで構成されており、多くの細胞で一様に発現されると考えられる (Mol. Cell. Biol. 11, 12, 674-684 (1992)). NF- $\kappa$ Bを制御する因子I $\kappa$ Bの存在も明らかとなっており、I $\kappa$ Bは、細胞時にNF- $\kappa$ Bと複合体を形成しており、NF- $\kappa$ Bの核移行シグナルをマスクすることにより、核移行を抑制している (Science, 242, 540-546 (1988), Cell, 61, 1281-1289 (1991), Cell, 69, 1109-1120 (1992), EMBO J., 12, 3893-3901 (1993), Cell, 78, 773-785 (1994), Cell, 87, 13-20 (1996)).  $\kappa$  連鎖遺伝子 $\alpha$  (以下、TNF- $\alpha$ ) 等で細胞を刺激すると、I $\kappa$ Bは急速するシグナル伝達分子により32および36番目のセリンがリン酸化、続いてユビキチン化され、プロテアソームによって分解される。I $\kappa$ Bが分解されると、NF- $\kappa$ Bは核への移行が可能となり、エンハンサーを内蔵した様々な転写因子を誘導するようになる (Cell, 80, 529-532 (1995), Cell, 80, 573-582 (1995)).

【0004】NF- $\kappa$ Bを活性化し誘導する物質あるいは刺激として、サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、腫瘍壊死因子 $\beta$  (以下、TNF- $\beta$ )、インターロイキン1 $\alpha$  (以下、IL-1 $\alpha$ )、インターロイキン1 $\beta$  (以下、IL-1 $\beta$ )、インターロイキン2 (以下、IL-2)、白血球阻止因子 (以下、LIF) 等)、T細胞マイトジェン (抗原刺激、レクチン、抗T細胞レセプター抗体、抗CD28抗体、抗CD28抗体、Caイオンフォア)、B細胞マイトジェン (抗IgM抗体、anti-CD40)、ロイコトリエン、リポ多糖 (以下、LPS)、ホルボールミリスチン酸アセテート (以下、PMA)、寄生体感染、ウイルス感染 (ヒト免疫不全症ウイルス (以下、HIV-1)、ヒトT細胞白血病ウイルス1 (以下、HTLV-1)、B型肝炎ウイルス (以下、HBV)、エプスタインバーウイルス (以下、EBV)、サイトメガロウイルス (以下、CMV)、単核ヘルペスウイルス1 (以下、HSV-1)、ヒトヘルペスウイルス6 (以下、HHV-6)、ニューカッスル病ウイルス (以下、NDV)、センダイウイルス、アデノウイルス等)、ウイルス産物 (二本鎖RNA、Tax、HBx、EBNA-2、LMP-1等)、DNA破増殖物質、タンパク質合成インヒビター類 (例えばシクロヘキシミド)、紫外線、放射線、酸化ストレス等が知られている (Biochemica et Biophysica Acta, 1072, 3-80 (1991), Annu. Rev. Cell Biol. 94)).

【0005】また、NF- $\kappa$ Bの活性化により誘導される分子としては、(1)炎症反応、免疫応答に関する分子群、(2)アポトーシスの抑制に関する分子群、(3)発生・分化に関する分子群、(4)ウイルスに關

る分子群等が知られており (Biochemica et Biophysica Acta, 1072, 63-80 (1991), Annu. Rev. Cell Biol. 10, 405-435 (1994))、誘導発現は多岐にわたっている。

【0006】誘導発現される分子として、具体的には、サイトカイン (IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、インターロイキン3 (以下、IL-3)、インターロイキン6 (以下、IL-6)、インターロイキン8 (以下、IL-8)、インターロイキン12 (以下、IL-12)、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、インターフェロン $\beta$  (以下、IFN- $\beta$ )、細胞増殖因子 (マクロファージコロニー刺激因子 (以下、M-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (以下、GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (以下、G-CSF))、レセプター (インターロイキン1レセプター (以下、IL-1R) アンタゴニスト、インターロイキン2レセプター $\alpha$  (以下、IL-2R $\alpha$ )、免疫グロブリン $\alpha$  軽鎖 (以下、Ig $\kappa$ -L) C)、T細胞レセプター $\beta$ 、主要組織適合抗原 (以下、MHC) クラスI、II、 $\beta$ 2-ミクログロブリン)、接着因子 (Endothelial Leucocyte adhesion molecule-1 (以下、ELAM-1)、vascular cell adhesion molecule-1 (以下、VCAM-1)、Interleukin adhesion molecule-1 (以下、ICAM-1))、急性期タンパク質 (血清アミロイドA前駆タンパク質、アンギオテンジノゲン、補体因子B、補体因子C3、補体因子C4)、腫瘍型NO合成酵素 (以下、iNOS)、シクロオキシゲナーゼ2 (以下、COX-2)、血管内皮細胞成長因子受容体 (以下、VEGFR-2)、転写因子 (c-Rel, p105, I $\kappa$ - $\alpha$ , c-Myb, インターフェロン調節因子 (以下、IRF-1))、ピメンチン、ウイルス (HIV-1, HIV-2, アカザル免疫不全症ウイルス (以下、SIVmac)、CMV、HSV-1、アカザルウイルス40 (以下、SV40)、アデノウイルス) 等が知られている (蛋白質雑誌, 41, 1198-1209 (1996)).

【0007】NF- $\kappa$ B活性化に關するシグナル伝達系は、TNF- $\alpha$ およびIL-1について説明が進んでいる。TNF- $\alpha$ からの活性化シグナルにおいては、TNFレセプター (TNFRIまたはTNFRII)、TNF receptor-associated death domain protein (以下、TRADD)、TNFR-associated factor-2 (以下、TRAF2)、receptor interacting protein (以下、RIP)、NF- $\kappa$ B-inducing kinase (以下、NIK)、I $\kappa$ B kinase $\alpha$  (以下、IKK) (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\gamma$  (NEMO))、IKK-complex-associated protein (以下、IKAP) 等が活性化分子として見出されている。 (EMBO J., 14, 2876-2883 (1995), Science, 267, 1485-1489 (1995), GENES & DEVELOPMENT, 9, 1586-1597 (1995), Cell, 84, 853-862 (1996), Nature, 388, 548-554 (1997), Cell, 90, 373-383 (1997))

7). Science, 278, 860-866 (1997), Science, 278, 866-869 (1997), Cell, 91, 243-252 (1997), Nature, 395, 292-296 (1998)).

【0008】IL-1からの活性化シグナルにおいて、IL-1 receptor 1 (以下、IL-1RI)、IL-1 receptor accessory protein (以下、IL-1RAcP)、Myd88、IL-1 receptor-associated kinase (以下、IRAK) TNF receptor-associated factor 6 (以下、TRAF6)、TAM binding protein 1 (以下、TAB1)、Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1) 等が活性化分子として見出されている (Science, 270, 2008-2011 (1995), Nature, 398, 252-256 (1999)).

【0009】一方、NF- $\kappa$ Bをリン酸化する酵素 (NF- $\kappa$ Bキナーゼ) がNF- $\kappa$ Bシグナルの増強に關与しているとも考えられてきた (J. Biol. Chem., 269, 790-797 (1994), EMBO J., 13, 4597-4607 (1994)). 以上のように、NF- $\kappa$ Bの活性化には非常に多くの分子が関与していることは知られているが、同定された全ての分子の役割が解明されているわけではない。紫外線や酸化ストレス等のTNF- $\alpha$ やIL-1以外の刺激では、NF- $\kappa$ Bの活性化に關与する分子は、ほとんど不明で、分子の組織特異的発現を見ても、組織特異的なNF- $\kappa$ Bの活性化機構が予想できない (Science, 284, 313-316 (1999), Science, 284, 316-320 (1999), Science, 284, 321-325 (1999), Immunity, 10, 421-429 (1999), Nature Genet., 23, 74-77 (1999)).

【0010】以上より、NF- $\kappa$ Bの活性化に關与している未知の分子は、生体内にまだ多く存在すると考えられ、これらの遺伝子を見出し利用することは、病態の解明あるいはNF- $\kappa$ Bに關与する疾患の治療にとって、大変有用である。前述したNF- $\kappa$ Bを活性化する分子群からわかるように、NF- $\kappa$ Bは生体内の免疫応答の増強において非常に重要な役割を担っている。抗腫瘍あるいは抗ウイルス活性を有する主要部分をNF- $\kappa$ Bの活性化を通して発揮している。また、NF- $\kappa$ Bにより誘導発現するIL-1、IL-2、IL-12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 等のサイトカインも、生体や組織における免疫応答に上乗せすることは、免疫応答の増強あるいは抗腫瘍・抗ウイルス活性の増強において非常に効果があると考えられる。従って、NF- $\kappa$ Bを活性化させるポリペプチドおよびそれをコードするDNA

の発見および取得、さらにはNF- $\kappa$ B活性化上昇変異体の発見および取得は、抗腫瘍・抗ウイルスをターゲットとした医薬において大変有用である。

【0012】一方で、NF- $\kappa$ Bによって誘導発現するIL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 等のサイトカインは、炎症性サイトカインとも呼ばれ、これらのサイトカインによって過度に増進された免疫応答が各種疾患の原因ともなっている。これらのサイトカインは、マクロファージ、好中球、リンパ球等を活性化し、炎症組織において増殖の方向に働く。また、NF- $\kappa$ Bにより誘導されたELAM-1、VCAM-1、ICAM-1等の接着分子は、白血球の組織への増殖を促進し、炎症組織での白血球の集積を助成する (Mol. Cell. Biol., 14, 5701 (1994), Mol. Cell. Biol., 14, 5820 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 3943 (1993)). iNOSやCOX-2等の酵素は、それぞれ一酸化窒素 (以下、NO) やプロスタグランジンE2を産生し、急性炎症や血管の拡張に作用する。

【0013】すなわち、NF- $\kappa$ Bは、これらの細胞あるいは分子を介して、急性炎症および慢性炎症において中心的役割を担っていると考えられる。同時に、慢性炎症性疾患の増強、クロロンの増殖、癌の肺組織等では、NF- $\kappa$ Bの活性化が報告されている。したがって、アレクザンダー、アトピー、喘息、花粉症、気管支炎、自己免疫疾患、慢性B型肝炎、花柳病、移植片対宿主疾患、インスリン依存性・非依存性糖尿病、外傷性脳損傷、炎症性腸炎、敗血症、微生物感染等、炎症が関与する疾患全般において、NF- $\kappa$ Bは、病態増悪および治療阻害の重要なターゲットである。

【0014】病との関連では、バーネットリンパ腫 (Burkitt lymphoma)、ホジキン (Hodgkin) 病、T、B、NK細胞リンパ腫、EBV関連胃癌等が、EBVが原因とされる。特にEBVがコードするlatent membrane protein (以下、LMP1) は、TRADDやTRAF2と結合が可能で、宿主のNF- $\kappa$ Bを活性化し、不死化に關与していると考えられる (EMBO J., 16, 6478-6485 (1997), J. Virology, 69, 2188-2194 (1995), Oncogene, 18, 7161-7167 (1999), Gene Therapy, 5, 905-912 (1998)). また、成人T細胞白血病 (Adult T-cell leukemia: ATL) は、HTLV-1による感染が原因であり、特にHTLV-1がコードするTaxが、I $\kappa$ Bへの結合あるいはIKKの活性化を通じて、NF- $\kappa$ Bを活性化し、アポトーシスを阻害していると考えられる (J. Biol. Chem., 273, 15891-15894 (1999), J. Biol. Chem., 274, 34417-34424 (1999)). NF- $\kappa$ Bが誘導する各種接合分子は、癌細胞の転移に關与している。NF- $\kappa$ Bによるアポトーシス阻害活性やVEGF・R2を介した血管新生は、癌細胞の増殖に關与している。以上のように、NF- $\kappa$ Bは、癌の分野において、重要な創薬あるいは治療ターゲットである。







nimal wa (ATCC, CRL-1432)、子宫颈癌細胞株 H e  
n (ATCC, CL-2)、腎細胞株 2 9 3 U、Gen. Vit. 3  
g、59-72 (1977) 等を用いることが、ほとい  
の哺乳動物の細胞としては、サル腎細胞株 COS-1  
(ATCC, CL-16 50)、サル腎細胞株 COS-7 (ATCC  
RL-1651)、Charynizer-2 ハムスター瘤 (Chinese  
Institute, Darity) 細胞株 H O (ATCC, CRL-9096、ATCC  
CL-61)、マウス細胞株 B o n f 3 (RIKEN Cell Bank R  
C9805)、マウス細胞株 L 9 2 9 (RIKEN Cell Bank R  
C8008)、ラット細胞株 R K 4 9 F (ATCC, CRL-157  
0)、ミンク細胞株 M y l u (ATCC, CL-64) 等を用い  
ることができる。節足動物としては、カイガサシイダ  
の、具体的には、*Spodoptera frugiperda* S f 株や S f  
1 2 1 株等を用いることができる。治療用タンパク性  
薬品や医薬品のスクリーニングターゲットとなる DNA  
の探検が目的の場合は、哺乳動物の細胞、特にヒトの細  
胞を好ましく用いることが好ましい。

[illegible]

【0067】(3) 本発明のDNAを取得する方法  
本発明のDNAは、細菌で発現させることによりNF- $\kappa$ Bを活性化するため、細菌におけるNF- $\kappa$ Bの活性性を出すことが可能なる方法を用いることにより、本発明のDNAを取得することができ、NF- $\kappa$ Bの活性化を出す方法として、以下の方法が挙げられる。

【0068】例へば、細胞抽出液を用いる方法として、  
 軽塩析剤抽出等への結合をアルブミン法（生化学）バイオ  
 テクニクス・ハンドブック第5版、5-107）等により解説する方  
 法（生化学）バイオテクノロジーズ5、197）等により解説する方  
 法（生化学）バイオテクノロジーズ7、179）等によ  
 り提出する方法が挙げられる。また、さらに効率的な、検  
 出する方法としては、レポーター遺伝子を利用して検出す  
 る方法とすることができる。レポーター遺伝子として使  
 用されるものは、ルシフェラーゼ、ヒト胎盤アルカリ・ホスファター  
 ゼ、β-ガラクトシダーラーゼ、クロモドーム、クロマフ  
 ィン、各種green fluorescent protein（以下 GFP）

等をコードする遺伝子を用いることができる。レポーター遺伝子に置換するプロモーターとしては、 $NF-\kappa B$  や  $\alpha$ -因子に転写されるプロモーターであるようなものにより転写を用いることができる。例えば、 $NF-\kappa B$  の活性化により発現が制御されている遺伝子のプロモーター領域で染色体DNAが細胞周期素阻化によって切り出すごとにより加齢したプロモーター-DNA断片、染色体DNAをモデルとしてPCR法によって増幅することによって得らるるプロモーター-DNA断片、または該プロモーターの塩基配列を有する合成DNA断片等が挙げられる。

【0069】具体的には、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-3、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、IFN- $\beta$ 、M-CSF、GM-CSF、G-CSF、L-2R $\alpha$ 、Ig- $\kappa$ -L、C、T細胞受容体 $\beta$ 、細胞カサシ、 $\beta$ 2-ミクログロブリン、LAME-1、VCAM-1、ICAM-1、血管内皮ミロイド膜タンパク質、アンギオテンシン、細胞因子B、細胞因子C3、細胞因子C4、INO5、COX-2、VEGF-R2、c-Rel、p10、IL-8、c-Myc、IRF-1、HIV-1、HIV-2、SIV $\alpha$ 、CMV、HSV-1、SV40、アデノウイルス等のプロモーターやそれらのコンセンサス配列を1個あるいは複数個有した合成プロモーターが採用され得る。

[illegible]

【0071】3. 本発明のポリブプレチドの製造

【0072】全長 cDNA をもとにして、必要に応じて、酸ポリペプチドをコードする部分を含む塩基長さを決定し、酸ポリペプチドを断片化する。該 DNA 断片、または全長 cDNA を適当な発現ベクターの 프로모ーターの下流に挿入することにより、組織発ベクターを制作する。該組織発ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを生産する。

質転換体を得ることができ、  
【0073】宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とすることできる。発現させるものであれば、いずれも用いることができる。発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自律複製可能なものは染色体中への組み込みが可能で、本発明のポリペプチドをコードする DNA を受容できる位置にプロモーターを含有し得るものを用いられる。

【0074】細菌等の微生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明のポリペプチドをコードするDNAを含む有してなる相換えベクターは菌宿主細胞中で自複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子、および転写終止配列より構成されるベクターであることが好ましい。尚、ベクターには、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0075】発現ベクターとしては、例えば、pBT2-p2a (Boehringer Mannheim社製)、pBac1 (Boehringer Mannheim社製)、pBac2 (Boehringer Mannheim社製)、pAC23.2.2 (Pharmacia社製)、pS280 (Invitrogen社製)、pCMEX-1 (Promega社製)、pYE-8 (QIAGEN社製)、pK710 (特開85-110600号)、pA27200 (Agric.ultural, Biological, Chemistry, 48, 669 (1998))、pMAM1 (Agric. Biol. Chem. 53, 277 (1988))、pPCV1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4206

(1985) ), pUescript 11 SV(-) (Stratagene社)  
pSP65 [Escherichia coli JM109/pT33 (FEM)  
pRSP-AP-407 より複製]、pT332 [Escherichia coli JM10  
9/pT332 (FEM RP-5408) より複製]、pRIIA2 [Escherichia  
coli [CUX2 (FER W-400) より複製、特開昭60-  
121119号]、pC24 [Escherichia coli IOKA2 (FEM RP-  
6798) より複製、特開昭60-22100号)、pIra2 (米国  
特許特許4,686,191号)、米国特許4,939,094号、および  
特許特許45,160,735号)、pSuper, pBI101, pT75, pC19  
[pC400 U. Bacteriol., 172, 2392 (1990) ]、pC  
X X [Pharmacia社製]、pET3システム (Novagen社製) 等  
に受け継がてることができ、異種ベクターとして、リボソ  
ム結合配列で示されるシャイン・ダルグァン (Shine-Dal  
garno) 配列と開始コドンとの間を適宜距離 (明々46へ1  
塩基) に調節したものが用いられる。

【00076】プロモーターとしては、宿主細胞中で発現させるものであるかならないものでもない。例えば、*lacP*、*trpP*、*phoP*、*P<sub>6</sub>*プロモーター、*T7*プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターおよび、*SPO1*プロモーター、*SPO2*プロモーター、*penP*プロモーター等を挙げることができるとする。また、*P<sub>6</sub>*をより適例としたプロモーター ( $P_{60} \times 2$ )、*lacP*プロモーター、*lacI7*プロモーター ( $P_{60} \times 2$ )、*lacP*プロモーター (Gene. 44: 29 (1986)) のような、人為的に構成されたプロモーター等も用いることが可能である。

ができる。

【0077】本発明のポリペプチドをコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に適合なコドンとなるように塩基を置換することにより、目的とするポリペプチドの生産率を向上させることができる。本発明の阻害ペプチドにおいては、本発明のDNAの発現には転写後修飾配列は必ずしも必要でないが、構造遺伝子の直下に転写後修飾配列を配置することは好ましい。

【0078】得主細胞としては、エシェリヒア属、セロタイプ6、バクテリス属、フレネトリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュドモナス属、シュドモナス属に属する微生物。例えば、*Escherichia coli* XU-89株、*Escherichia coli* XZ-Blue、*Escherichia coli* DH1、*Escherichia coli* WC1000、*Escherichia coli* KY3 2676、*Escherichia coli* W485、*Escherichia coli* JN10 2、*Escherichia coli* JB101、*Escherichia coli* No. 4、*Escherichia coli* W310、*Escherichia coli* W49、Serratia marcescens、Serratia fonticola、Serratia lig aris、*Bacillus subtilis* var. spizizenii、*Bacillus anthracis*、*Bacillus pasteurii*、*Bacillus cereus*、*Bacillus pumilus*、*Bacillus thuringiensis*、*Brevibacterium linariae* ATCC14986、*Brevibacterium ascherozyma* ATCC14068、*Brevibacterium flavum* ATCC14067、*Brevibacterium lactoferre*

2. *Microbacterium ammoniaphilum* ATCC13534, *Pseudomonas* sp. D-101等を挙げることができた。

【0079】超快セクエンターの導入方法としては、上記の宿主細胞へDNAを導入する方法であれば、いずれも用いることができる。例えば、カルシウム・オニオンを用いる方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 210 (1972))、プロトプラズム法(特開昭63-248394号)、またG<sub>+</sub> Gene, 17, 107 (1982) やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979) に記載の方法等を挙げることができる。

[illegible]

【0081】 担生細胞としては、サッカロミセス属、ク  
 ユイペロミセス属、トリコスポロ属、シュワニサミ  
 ス属等に属する微生物、例えば、*Saccharomyces cere*  
*visiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces*,  
*Trichosporon pullulans*, *Schwanniomyces all*

27

ウイルス等を挙げることができる。組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 (Methods, Enzymol., 194, 182 (1990))、スファエロプラスチ法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978))、酢酸リチウム法 (J. Bacteriol. 153, 163 (1983))、(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)) 記載の方法等を挙げることができる。

【0082】動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pCDNA1.pc88 (フナコ社製)、pACE107 (特開平3-22079)、pCytocytology, 3, 133(1990)、pMS3-3 (特開平2-227075)、pCD88 (Natu re, 329, 840 (1987))、pCDNA1/A mp (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pACE103 (J. Biochem. biol., 101, 1307 (1987))、pACE210等を挙げることができ。

【0083】プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の IE (Immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロポネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRαプロモーター等を挙げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーター共に用いてもよい。

【0084】宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ(Namaliwa)細胞、サル科の細胞であるCOS細胞、チャイニーズハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-290)等を挙げることができ。組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133 (1990))、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987))等を挙げることができる。

【0085】昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー・サブリメント1-38 (1987:1997)、Recu ovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technol ogy, 9, 47 (1988)等に記載された方法によって、本発明のポリペプチドを発現させることができる。

【0086】即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキロウイルスを昆虫細胞に共同導入して昆虫細胞培養液中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、本発明のポリペプチドを発現させることができる。該方法においては、組換えウイルス導入ベクターとしては、例えば、pUL1392, pUL1393, pU chell11(ともにInvitrogen社製)等を挙げることができ。

28

【0087】バキロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグランド・カ リフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。昆虫細胞としては、Spodop tera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21[B aculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manu al, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、I riclophesla 11の卵巣細胞であるH1g5 (Invitrog en社製)等を用いることができる。

【0088】組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキロウ イルスの共同導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987))等を挙げることができ。植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タ バコモザイクウイルスベクター等を挙げることができ。

【0089】プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV)の35Sプロモーター、イカククテン1プロモーター等を挙げることができ。宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマ、コムギ、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等を挙げることができ。

【0090】組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリア (Agrobacteriu m) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/0097) 、エレクトロポレーション法 (特開昭60-251887)、パーティクルガン (遺伝子銃)を用いる方法 (特許第2606836、特許第2517813)等を挙げることができる。

【0091】遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クロニング第2版に記載されている方法等に基づいて、分泌生産、融合ポリペプチド発現等を行うことができる。酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が附加されたポリペプチドを得ることができる。

【0092】本発明のDNAを組み込んだ組換え発現ベクターを保有する形質転換体を宿主に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成させる。該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する場合には、該生物が質化し得る培養液、炭素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率化し、行える媒体であれば天然媒体、合成媒体のいずれを用いてもよい。

29

【0093】炭素源としては、該生物が質化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これら含有する糖類、デンプンあるいはデンプン加水分解物の炭水化物、砂糖、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロピール等のアルコール類等を用いることができる。窒素源としては、アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機塩もしくは有機塩のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆胚芽および大豆粕加水分解物、各種酵母菌体およびその抽出物等を用いることができる。

【0094】無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、硫酸カルシウム等を用いることができる。培養は、通常培養培地または滅菌通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15〜40℃がよく、培養時間は、通常16時間〜7日間である。培養中のpHは3.0〜9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機酸、アルカリ性塩、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0095】また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインプロビル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG)等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA)等を培地に添加してもよい。

【0096】動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する媒体としては、一般に使用されているRPM I1640培地 (The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967))、EagleのMEM培地 (Science, 122, 501 (1952))、ダルベッコ改良MEM培地 (Virology, 8, 396 (1959))、199培地 (Proceeding of the Society for the Biolog ical Medicine, 73, 1 (1950))またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。培養は、通常pH6〜8、30〜40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下の条件下1〜7日間行う。また、培養中に必要に応じて、カナイシン、ベニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0097】昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する媒体としては、一般に使用されているTNI-FH培地 (Pharmingen社製)、Sf-900 I1 SFM培地 (Life Technologies社製)、Ex Cell 400、

30

Ex Cell 405 (いずれもJRI Biosciences社製)、Grace's Insect Medium (Nature, 195, 788 (1962))等を用いることができる。培養は、通常pH6〜7、25〜30℃等の条件下、1〜5日間行う。また、培養中に必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0098】植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や組織を分化させて培養することができる。形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンダーソン(MS)培地、ホワイト(WHITE)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。培養は、通常pH5〜9、20〜40℃の条件下で3〜60日間行う。また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0099】本発明のポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を定めることにより、該方法を選択することができる。本発明のポリペプチドが宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ホーレンソンの方法 (J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989))、ロウチの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 827 (1989))、Genes Development, 4, 1288 (1990))、または特開平5-336993、W 094/23021等に記載の方法を適用することにより、該ポリペプチドを宿主細胞外に機能的に分泌させることができる。

【0100】すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの断片にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に機能的に分泌させることができる。また、特開平222075に記載されている方法に基づいて、ジヒドロキボリン誘導体誘導体を用いた遺伝子発現系を利用して生産量を増やすこともできる。

【0101】さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物細胞 (トランスジェニック非ヒト動物)または植物細胞 (トランスジェニック植物)を生成し、これらの細胞を用いて本発明のポリペプチドを製造することもできる。形質転換体が動物細胞または植物細胞の場合は、通常のの方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成させる。該動物細胞または植物細胞より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

【0102】動物細胞を用いて本発明のポリペプチドを製造する方法としては、例えば公知の方法 (American Journal of Clinical Nutrition, 53, 639S (1996))、Am



rican Journal of Clinical Nutrition. 63, 627S (1996). Bio/Technology. 9, 830 (1991)) に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に本発明のポリペプチドを産する方法が挙げられる。

【0103】動物団体の場合は、例えば、本発明のポリベクトルに動物のDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、該ポリベクトルを該動物中に生成・繁殖させ、該動物中より該ポリベクトルを採取することにより、該ポリベクトルを製造することができ、該動物中の該繁殖所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭39-109192）、卵等を挙げることができ、この際に用いられるプロモーターとしては、動物で繁殖できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである $\alpha$ カゼインプロモーター、 $\beta$ カゼインプロモーター、 $\beta$ ラクタログロブリンプロモーター、ホエー蛋白性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0104】植物個体を用いて本発明のポリペプチドを製造する方法とは、例えば本発明のポリペプチドをコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法（組織培養、20 (1994)、組織培養、21 (1995)、Trends in Biotechnology、15、45 (1997)) に準じて製造し、該ポリペプチドを該植物中に生成、蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを生産する方法が挙げられることとなる。

【0105】本発明の両重転換体により製造されたポリペプチドは、例えば本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で現れた場合は、培養終了後、細胞を浸漬分離により回収し、水相緩衝液にけん層後、超高速遠心分離、フレンチプレス、マントンカウリンホモゲナイザーを用いる。該無細胞抽出物を殺菌し、無細胞抽出物を得る。異なる無細胞抽出物を混合することによって得られる上清から、通常の従来の単離精製法、即ち、溶剤抽出法、硫酸アミエール法、脱脂法、有機溶剤による沈殿法、ジエチルアミン塩化（DEAE）セファレーション、DIAIONHPA-75（三美化成社製）等レジエンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー等のレジエンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファローズ、フェニルセファローズ等のレジエンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いた分選法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォースーカシオング法、導電率電気泳動等の電気泳動法等の手法を並置あるいは組み合わせて用い、精製品を得ることができると考えられる。

【0106】また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、過心分離を行うことにより、沈殿分としてポリペプチドの不溶体を回収する。回収したポリペプチドの不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶性液を希釈生

たは選析することにより、該ポリペプチドを正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該ポリペプチドの精製標品を得ることができる。

【0107】本発明のポリビブチドあるいはその断片修飾体等の断片体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリビブチドあるいはその断片修飾付加体等の断片体を回収することができ、即ち、該断片物を上記と同様の分離開析の手法により処理することにより、可溶性成分を得、分離開析を得、該可溶性成分から、上記と同様の断片修飾変法を用いることにより、精製断片を得ることができ、

【0108】また、本発明のポリペプチドは、Fmoc 法（フルオレンニルオキシカルボニル法）、tBoc 法（tertブトキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced Chemtech社、Perkin-Elmer社、Aersham Pharmacia Biotech社、Protein Technology Instrument社、Synthelabo社、Vegetis社、PerSeptive社、高橋製薬所等のペプチド合成装置を利用して合成することもできる。

【0109】4. 本発明のポリペプチドを認識する抗体の調製

本発明のポリペプチドまたは該ポリペプチドの部分断片は、本発明のポリペプチドの精製製品、あるいは本発明のポリペプチドの一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチドを抗原として用いることにより、ポリクロナル抗体、モノクローナル抗体等、本発明のポリペプチドを認識する抗体を調製することができ、

【0110】(1) ポリクロロナル本体の作製

【0101】投与する動物として、ウサギ、ヤブ、3〜6ヶ月の雌の通常のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。該抗腫のペプチドを用いた四日間50〜100mg/kgが好ましい。ペプチドを用いる場合は、ペプチドはケイロシチン酸ヘキサアセチルヘキサミン (keyhole limpet haemocyanin) やチチログロブリン等のキャリア蛋白に共付結合させることができるのが望ましい。抗腫にするペプチドは、ペプチドが成機で合成することが好ましい。

【0112】抗抗原の投与は、1回目の投与の後、1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に直前直後より採血し、血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法（酵素免疫測定法（EIA）A法：医学書院刊（1976年）、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory（1981））等で検定する。

【013】免疫に用いた抗原に対し、その血清が充分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を収得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を収得することができる。分離、精製する方法としては、過心分離、40～50%硫酸アモンモニウムによる塩析、カブリン酸沈殿 (Antibodies, A laboratory manual, 1. Cold Spring Harbor Laboratory, (1988) )、または DEAE-セファロースラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはイオン交換カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法が挙げられる。

【0114】(2)モノクローナル抗体の作製  
(a)抗胚着性細胞の調製  
免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを、胚着性細胞の供体として供する。胚着性細胞を示したラットに抗原物質を最終投与した後3〜7日目に、脾臓を摘出する。

【0115】細胞をMEM培地（日本製薬社）中で細断し、ペンゼットでほぐし、1, 200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨て、得られた沈殿分の脾細胞をトリプシン-塩化アンモニウム緩衝液（pH7. 6）で1〜2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

【0116】 (b) 骨髄細胞の培養

供体細胞としては、マウスまたはラットがアニミキ性マウス株細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス株細胞(BALB/3T3) 骨髄細胞培養液 P 3-X 6 3 A 8-g-U-1 (以下、P 3-U-1と略す) (Curr. Topics, Microbiol., Immunol., 81, 1 (1978), Europ. J. Immunol., 8, 511 (1978)), SP 2/0-A 8 14 (SP-22) (Nature, 276, 269 (1978)), P 3-X 6 3-A 8-g-U-3 (6 5 3) (U. Immunol., 123, 1548 (1977)), P 3-X 6 3-A 8 (X 6 3) (Nature, 256, 495 (1975)) 等を用いることができる。これらの細胞系は、8-アザグアニン培地 (400ml:1640培地:グルタミン酸:1.5 mmol/l)、2-メルカプトエタノール (5×10<sup>-3</sup> mol/l)、ジェンタマイシン (10 mg/ml) および牛胎児血清 (FCS) (CSII社製, 10%) を加えた培地 (以下、正常培養液) に、さらに8-アザグアニン (15 μg/ml) を加えた培地) で培養するが、細胞増殖は3~4日に正常培地で培養液に代わって細胞増殖は2×10<sup>4</sup>以上行なわれる。

**【0117】**(c) ハイブリドーマの作製  
 (b)で取得した抗体産生細胞と(b)で取得した脊髄腫細胞をMEM培地またはPBS(リン酸二ナトリウム1.8g、β-グルコース1.0g、カルシウム0.2g、食塩7.65g、炭水化物0.2g)でよく洗浄し、細胞数を数え、抗体産生細胞濃度は $5 \times 10^5$ /mlになるように調整する。

う混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、  
上清を捨てる。

【0118】得られた沈降成分の細胞数をよくほぐし、細胞懸液に、検片しながら、37℃で、 $10^6$ 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングリコール1000 (PEG-C-1000) 2g、MEM 2ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7ml を混合した溶液を、 $0.2 \sim 1$  ml 添加し、さらに1~2分間毎にMEM培地へ2mlを数回添加する。

【0119】添加後、MEM培地に加えて全量が5.0 mlになるように調整する。調整後培地を900 rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた細胞成分の細胞懸液を、ゆるやかにほぐし、メスベットの先端による吸込み、吹出でゆるやかにHAT培地（正相培地）にホウサンチン（ $10^{-4}$  mol/l）、チミジン（ $1.5 \times 10^{-3}$  mol/l）およびアミノプテリン（ $4 \times 10^{-5}$  mol/l）を加えた培地（0.0 ml）に4×10<sup>5</sup>個の細胞を接種する。

【0120】膨張層成を96.6%の塩化用プレートに100  
μm/バツ分注し、5%CO<sub>2</sub>キャベーター中、  
37℃で7～14日間培養する。培養後、培養上清の一  
部をカマンボディデスリブ (Antibodies, A. Laboratory  
Inc., Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14  
annual) 等に添加されている酵素免疫検定法により、  
(1988) 年に知られている酵素免疫検定法により、  
本発明のポリリブアプテチンと選択的にポリリブア  
チンに反応するハイブリドームを選択的に特異的

[illegible]

【0122】該ハイブリドマを用いて、陽性選択法によりクロニングを2回繰り返す(1回目は、HT増地(HAT増地からアミノプテリンを除いた増地)、2回目は、正常増地を使用する)、安定して強い抗体を産生するハイブリドマ株として選択する。

(d) モノクローナル抗体の調製  
プロピスタスタン処理 (2, 6, 10, 14-エートラメルベ  
リタチン) 0.5% を細胞内投与し、2  
週間培養する。した8~10 週目のマウスまたはヌード  
マウスに、(c) で取得した未発現のハイブリッドに對  
するモノクローナル抗体を産生ハイブリド細胞5~2  
×10<sup>4</sup>個/匹を腹腔内に注射する。10~21日  
の間、マウスは飼育液に溶化す。









存在下でNF- $\kappa$ B活性化を抑制する該ポリペプチドの  
変質体を選択することにより、ドミナントネガティブ変  
質体を得ることができる。

【0186】具体的には、該ポリペプチドの変質体をレ  
ポーター細胞に導入し、サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、T  
NF- $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-1F  
等)、T細胞マイトゲン(抗原刺激)、レクチン、抗  
細胞レセプター抗体、抗CD2抗体、抗CD3抗体、抗  
CD28抗体、Caイオンフォア)、B細胞マイトジェ  
ン(抗1gM抗体、anti1-CD40)、ロイコトリ  
エン、LPS、PMA、寄生体感染、ウイルス感染(H  
IV-1、HTLV-1、HBV、EBV、CMV、H  
SV-1、HHV-6、NDV、センダイウイルス、ア  
デノウイルス等)、ウイルス産物(二本鎖RNA、Ta  
x、HBX、EBNA-2、LMP-1等)、DNA破  
断物質、タンパク質合成インヒビター類(例えばシク  
ロヘキシミド)、放射線、放射線、酸化ストレス等のN  
F- $\kappa$ Bを活性化させる刺激を与え、レポーター遺伝子  
質体を導入していない場合よりも低下した該ポリペプ  
チドの変質体を選択することにより、ドミナントネガ  
ティブ変質体を得ることができる。

【0187】例、得られたドミナントネガティブ変質体  
(Dominant Negative mutants：優性阻害型変質体)  
は、炎症を抑制する細胞の増殖抑制に使用可能であ  
り、該ドミナントネガティブ変質体を選択するDNA  
は、NF- $\kappa$ Bの活性化に伴う疾患の遺伝子治療に利用  
できる可能性がある。以下に実施例をあげ、本発明を  
具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のた  
めのものであり、本発明の技術的範囲を制限するもので  
はない。

#### 【0188】

【実施例1】ヒト大腸およびヒト脂肪組織由来  
完全培養cDNAライブラリーの作成  
ヒトの大腸および脂肪組織より、モレキュラー・クロ  
ニング第2版に記載の方法によりmRNAを抽出した。  
さらに、オリゴdTセルロースでpolyA<sup>+</sup>RNAを  
精製した。それぞれのpolyA<sup>+</sup>RNAよりオリゴ  
ヌクレオチド(5'-GGG-3')を用いて、cDNA  
ライブラリーを作成した。Oligo-cap linker (配列番  
号11)およびOligo dT primer (配列番号12)を用  
い、蛋白質誘導剤、41、197-201(1996)またはGene  
200、149-156(1997)に記載の方法に従って、BAP (B  
acterial Alkaline Phosphatase) 処理、TAP (Tobacco  
Acid Phosphatase) 処理、RNAライゲーション、  
第一鎖cDNAの合成とRNAの除去を行った。得られ  
た第一鎖cDNAを鋳型として、5'末端側のセンス  
プライマー(配列番号13)と3'末端側のアンチセンス  
プライマー(配列番号14)の2種のプライマーを用い  
るPCRにより二本鎖cDNAを増幅し、S<sub>1</sub>で切  
断した。PCRは、市販のキット：GeneAmp X

L PCRキット (Perkin Elmer社) を使用して、9  
5℃で5分間熱処理後、95℃で1分間、58℃で1分  
間および72℃で10分間の反応サイクルを12回繰り返  
し、その後4℃で保持することにより行なった。  
【0189】U<sub>18A</sub>111で切断したベクター-pEISFL  
3 (GeneBank AB008864、発現ベクター、3392bp) に上記  
増幅cDNAを導入し、cDNAライブラリーを作成し  
た。得られたクローニングミッドDNA各々につい  
て、cDNAの5'端と3'端の塩基配列を、DNAシー  
ケンシング試薬 (Dye Terminator Cycle Sequencing  
Ready Reaction Kit, dideoxynucleoside Terminator Cycle  
Sequencing FS Ready Reaction KitまたはBigDye Term  
inator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit、PE B  
iosystems社製) を用い、マニキュールにしたがってシー  
ケンシング反応を行った後、DNAシーケンサー (ABI  
PRISM 377、PE Biosystems社製) を用いて塩基配列を決  
定した。

【0190】【実施例2】NF- $\kappa$ Bエンハンサーによ  
るレポーター遺伝子発現抑制の検出  
レポーター遺伝子発現抑制の検出は、レポーター細胞  
株の樹立  
1FN- $\beta$ のNF- $\kappa$ B阻害配列(配列番号15)を  
3回繰り返した人工エンハンサーを構築し、レポーター  
細胞株に導入し、96-103(11989)のレポーター細胞  
株の5'上流域に導入した(以後、pF-lucとよぶ。  
該プラスミド 4 $\mu$ g/mlとなるようにT<sub>7</sub>緩  
衝液(10mmol/lトリリス-HCl(pH8.  
0)、1mmol/l EDTA (エチレンジアミン4  
酢酸ナトリウム)に溶解し、エレクトロポレーション  
法(810-000社製：Gene Pulser<sup>TM</sup>)によって、ヒト腎細  
胞株293 (Clontech社製) 1.5 $\times$ 10<sup>6</sup>個に遺伝子導  
入した。pF-lucは、ハイグロマイシン (hygromycin)  
耐性遺伝子を含んでおり、遺伝子導入後は、ハイグロ  
マイシン0.2g/mlを添加したRPMI1640 (RPMI1  
640 (日本化成社製)、10% 胎児血清、0.05  
mmol/l 1-メチルカプトエタノール、25 U/ml  
ペニシリンG、25 U/ml ストレプトマイシン) で培  
養、ハイグロマイシンを遺伝子導入の選択マーカーとし  
て安定形質転換株を樹立した。安定形質転換株のうち、  
TNF- $\alpha$ 刺激によって、無刺激と比較して670倍と  
いう高いレポーター遺伝子発現を示す株を選択(以  
下、293/F10Cとよぶ)し、以下の発現アッセイに  
用いた。

【0191】【実施例3】293/F10C-LUCを用い  
た完全培養DNAのNF- $\kappa$ B活性化に対する解析  
【実施例1】で増幅配列を決定したクローニング、アンゼ  
ン(100 mg/ml)を添加した2 $\times$ YT培地 (Yeast  
extract 10 g/l, Tryptone 16 g/l, NaCl 5g/l) 2 ml  
中、37℃で、16時間、各々振盪培養した。培養  
後、菌体を遠心分離機で回収し、プラスミド調製キット

(QIAprep Turbo MiniPrep Kit, QIAGEN社製) を用い  
て溶質質料の方法で各プラスミドを精製した。96ウ  
エルプレートに293/F10C-LUC細胞を1ウエルあ  
たり20,000個となるように分注し、37℃で、1  
6時間、CO<sub>2</sub>インキュベーター中で培養した。この培  
養細胞に、上記プラスミド約0.25 $\mu$ gをそれぞれ  
ポフェクション試薬 (LIPFECT AMINE 2000<sup>TM</sup> Reagen  
t, GIBCO BRL社製) を用いて、溶質質料の方法に従っ  
て導入した。37℃で、16時間、CO<sub>2</sub>インキュベ  
ーター中で培養後、ルシファゼーゼ活性測定試薬 (ARVO  
1420 MULTILABEL COUNTER, WALLAC社製) を用いて、ル  
シファゼーゼ活性を測定した。

【0192】その結果、COL03279 (配列番号6  
の塩基配列を有するDNAクローニング)、COL0677  
2 (配列番号7の塩基配列を有するDNAクローニング)  
ADKA01604 (配列番号8の塩基配列を有するDNA  
クローニング)、ADSU00701 (配列番号9の塩  
基配列を有するDNAクローニング)、CAS01989  
高配列を有するDNAクローニング) の塩基配列を有するDNAクロー  
ニング) の塩基配列を有するDNAクローニング) の  
各クローニングのプラスミドを導入した場合において、それ  
ぞれレポーター遺伝子発現が抑制された。該クローニングより、本発明  
のDNAを各々取得した。

【0193】【実施例4】本発明のDNAの各種調製に  
おける発現量の検出

COL03279、COL06772、ADKA016  
04、ADSU00701の各クローニングに認められる本  
発明のDNAの各種調製における発現量の検出、定法  
(PCR Protocols, Academic Press (1990)等) に従い、  
半定量的PCR法を用い、以下のように行なった。また、  
どの細胞でも同様に発現していると考えられるグリセ  
ロール-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) の転写  
産物の量を同時に検出し、細胞間のmRNA量の違  
いや、サンプリング時の逆転写酵素によるmRNAから  
本鎖cDNAへの逆転写効率に大きな違いを確認した。

【0194】ヒト脂肪由来のmRNA (Clontech社製)  
1胎児肝臓、2胎児肝臓、23乳癌、24胎盤、25胎  
胎、26胎盤、27胎盤、28胎盤、29胎盤、3  
0胎、31胎盤、32胎盤、33胎盤、34胎盤、3  
5胎盤) からcDNA合成キット (SUPERSCRIPT<sup>TM</sup> Pro  
cessing Kit, Gibco BRL社製) を用いて、一本鎖cD  
NAを合成した。1 $\mu$ gのmRNAから一本鎖cDNA  
を合成し、水で240倍希釈してPCRの鋳型として使

Tyr Ser Lys Leu Arg Ala Gln Asn Gln Val Leu Lys Lys Gly Val Val  
20 25 30  
Asp Glu Gln Ala Asn Ser Ala Ala Leu Lys Glu Gln Leu Lys Met Lys  
35 40 45  
Asp Gln Ser Leu Arg Lys Leu Gln Gln Glu Met Asp Ser Leu Thr Phe  
50 55 60  
Arg Asn Leu Gln Leu Ala Lys Arg Val Glu Leu Leu Asp Glu Leu  
65 70 75 80  
Ala Leu Ser Glu Pro Arg Gly Lys Asn Lys Lys Ser Gly Glu Ser  
85 90 95  
Ser Ser Gln Leu Ser Ser Gln Glu Gln Lys Ser Val Phe Asp Glu Asp Leu  
100 105 110  
Gln Lys Lys Ile Glu Glu Asn Glu Arg Leu His Ile Gln Phe Glu  
115 120 125  
Ala Asp Glu Gln His Lys His Val Glu Ala Glu Leu Arg Ser Arg Leu  
130 135 140  
Ala Thr Leu Glu Thr Glu Ala Ala Gln His Gln Ala Val Val Asp Gly  
145 150 155 160  
Leu Thr Arg Lys Tyr Met Glu Thr Ile Glu Lys Leu Gln Asn Asp Lys  
165 170 175  
Ala Lys Leu Glu Val Lys Ser Gln Thr Leu Glu Lys Glu Ala Lys Glu  
180 185 190  
Cys Arg Leu Arg Thr Glu Cys Gln Leu Gln Leu Lys Thr Leu His  
195 200 205  
Glu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Glu Glu Ser Leu Ser Ile Ile Asn Glu  
210 215 220  
Lys Val Pro Phe Asn Asp Thr Lys Tyr Ser Gln Tyr Asn Ala Leu Asn  
225 230 235 240  
Val Pro Leu His Asn Arg Arg His Gln Lys Lys Met Arg Asp Ile Ala  
245 250 255  
Gly Gln Ala Leu Ala Phe Val Gln Asp Leu Val Thr Ala Leu Leu Asn  
260 265 270  
Phe His Thr Tyr Thr Glu Gln Arg Ile Gln Ile Phe Pro Val Asp Ser  
275 280 285  
Ala Ile Asp Thr Ile Ser Pro Leu Asn Gln Lys Phe Ser Gln Tyr Leu  
290 295 300  
His Glu Asn Ala Ser Tyr Val Arg Pro Leu Glu Glu Gly Met Leu His  
305 310 315 320  
Leu Phe Glu Ser Ile Thr Glu Asp Thr Val Thr Val Leu Glu Thr Thr  
325 330 335  
Val Lys Leu Lys Thr Phe Ser Glu His Leu Thr Ser Tyr Ile Cys Phe  
340 345 350  
Leu Arg Lys Ile Leu Pro Tyr Gln Leu Lys Ser Leu Glu Glu Cys  
355 360 365  
Glu Ser Ser Leu Cys Thr Ser Ala Leu Arg Ala Asn Leu Glu Leu  
370 375 380  
Ser Gln Asp Met Lys Lys Met Thr Ala Val Phe Glu Lys Leu Gln Thr  
385 390 395 400

細胞の働きに基づき、抗腫瘍、動脈硬化、呼吸器等の平滑筋  
細胞の異常な分化増殖を伴う疾患、多臓器不全、全身性  
炎症反応症候群 (SIRS: systemic inflammatory r  
esponse syndrome)、成人呼吸器症候群 (ARDS: a  
dult respiratory distress syndrome) 等の治療薬の探  
索、開腹に有用なポリペプチド、ポリペプチドをコー  
ドするDNA、該DNAのアンチセンスDNA/RN  
A、該DNAを用いた遺伝子治療、ポリペプチドを認  
識する抗体、ポリペプチドの活性上昇変体、ポリ  
ペプチドのドミナントネガティブ変体、およびこれら  
の利用法を提供することができる。

【0197】  
【配列番号11-人工配列の説明：合成DNA (オリゴキ  
ャップリンカー配列)  
配列番号12-人工配列の説明：合成DNA (オリゴdT  
プライマー配列)  
配列番号13-人工配列の説明：合成DNA (5'末端側の  
センスプライマー配列)  
配列番号14-人工配列の説明：合成DNA (3'末端側の  
アンチセンスプライマー配列)  
配列番号15-人工配列の説明 (転写因子NF-κ 結合配  
列)  
配列番号16-人工配列の説明：合成DNA (組織発現分  
布を検討した合成プライマー配列)  
配列番号17-人工配列の説明：合成DNA  
配列番号18-人工配列の説明：合成DNA  
配列番号19-人工配列の説明：合成DNA  
配列番号20-人工配列の説明：合成DNA  
配列番号21-人工配列の説明：合成DNA  
配列番号22-人工配列の説明：合成DNA  
配列番号23-人工配列の説明：合成DNA  
【0198】  
【配列例】

用した。PCR用プライマーとしては、COL0327  
9からの塩基配列情報に基づいた配列番号16および1  
7、COL06772からの塩基配列情報に基づいた配  
列番号18および19、ADKA01604からの塩基  
配列情報に基づいた配列番号20および21、ADSU  
00701からの塩基配列情報に基づいた配列番号22  
および23に配載の合成DNAを用いた。PCR反応  
は、ニッポンジェン社製のRecombinant Taq DNA Polyme  
rase (GeneTaq) と添付の10×Gene Taq Universal Bu  
fferおよび2.5 mmol/L dNTP Mixtureを用  
いて、説明書に従って行った。MJ RESERCH社  
製のサーマル・サイクラーを用いて、94℃で30秒  
間、60℃で1分間、72℃で2分間の反応を26~3  
0サイクル行った。反応液をアガロースゲル電気泳動法  
およびエチジウムブロムリッド染色により解析した。  
【0195】結果を図1~4に示す。COL0327  
9、COL06772、ADKA01604、ADSU  
00701の各クローンに認められる本発明のDNA  
は、各クローン、各説明によって強調の態様あるもの  
の、検出した35塩基までの順序で発現していた。

【0196】  
【発明の効果】本発明によれば、アレルギー、アトピ  
ー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患、移植対  
宿主疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、エン  
ドトキシンショック、敗血症、発熱性ショック、慢性肝  
炎、慢性C型肝炎、インスリン依存性・非依存性糖尿病  
病、糸球体腎炎、外傷性脳挫傷、乾癪、潰瘍、各種脳脊  
髄炎、うつ病、心不全、炎症性腸疾患等の感染や免疫を  
伴う疾患、パーキンソン病、ホジキン病、各種リン  
パ腫、成人T細胞白血病、慢性肺病等の異常な細胞増殖  
を伴う疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節炎等の異常  
な線維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、エイズ等  
のウイルス性疾患、虚血性脳疾患の神経細胞の働きに基  
づく疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経

SEQUENCE LISTING  
<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
<120> Novel polypeptide  
<130> H12-0641J5  
<140>  
<141>  
<160> 21  
<170> PatentIn Ver. 2.1  
  
<210> 1  
<211> 780  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 1  
Met Ala Ser Ala Glu Leu Gln Gln Gly Lys Tyr Gln Lys Leu Ala Gln Glu  
1 5  
10 15





130 135 140  
Phe Ile Glu Ala His Leu Cys Leu Asn Asn Ser Asp His Asp Arg Leu  
145 150 155  
His Thr Leu Val Thr Glu His Cys Phe Pro Asp Met Thr Trp Asp Ile  
165 170 175  
Lys Tyr Lys Thr Val Arg Trp Ser Phe Val Glu Ser Leu Glu Pro Ser  
180 185 190  
His Val Val Glu Val Arg Cys Ser Met Met Asn Glu Gly Asn Val  
195 200 205  
Tyr Gly Gln Ile Thr Val Arg Met His Thr Arg Gln Thr Leu Ala Ile  
210 215 220  
Tyr Asp Arg Phe Gly Arg Leu Met Tyr Gly Gln Glu Asp Val Pro Lys  
225 230 235  
Asp Val Leu Glu Tyr Val Phe Glu Lys Gln Leu Thr Asn Pro Tyr  
245 250 255  
Gly Ser Trp Arg Met His Thr Lys Ile Val Pro Pro Trp Ala Pro Pro  
260 265 270  
Lys Gln Gln Ile Leu Lys Thr Val Met Ile Pro Gly Pro Gln Leu Lys  
275 280 285  
Pro Glu Glu Tyr Glu Glu Ala Gln Gly Glu Ala Gln Lys Pro Gln  
290 295 300  
Leu Ala  
305

【0202】

<210> 4  
<211> 261  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 4  
Met Lys Pro Arg Lys Ala Glu Pro His Ser Phe Arg Glu Lys Val Phe  
1 5 10 15  
Arg Lys Lys Pro Pro Val Cys Ala Val Cys Lys Val Thr Ile Asp Gly  
20 25 30  
Thr Gly Val Ser Cys Arg Val Cys Lys Val Ala Thr His Arg Lys Cys  
35 40 45  
Glu Ala Lys Val Thr Ser Ala Cys Gln Ala Leu Pro Pro Val Glu Leu  
50 55 60  
Arg Arg Asn Thr Ala Pro Val Arg Arg Ile Glu His Leu Gly Ser Thr  
65 70 75 80  
Lys Ser Leu Asn His Ser Lys Gln Arg Ser Thr Leu Pro Arg Ser Phe  
85 90 95  
Ser Leu Asp Pro Leu Met Glu Arg Arg Trp Asp Leu Asp Leu Thr Tyr  
100 105 110  
Val Thr Glu Arg Ile Leu Ala Ala Phe Pro Ala Arg Pro Asp Glu  
115 120 125  
Gln Arg His Arg Gly His Leu Arg Glu Leu Ala His Val Leu Gln Ser  
130 135 140  
Lys His Arg Asp Lys Tyr Leu Leu Phe Asn Leu Ser Glu Lys Arg His

145 150 155 160  
Asp Leu Thr Arg Leu Asn Pro Lys Val Gln Asp Phe Gly Trp Pro Glu  
165 170 175  
Leu His Ala Pro Pro Leu Asp Lys Leu Cys Ser Ile Cys Lys Ala Met  
180 185 190  
Glu Thr Trp Leu Ser Ala Asp Pro Gln His Val Val Leu Tyr Cys  
195 200 205  
Lys Val Gly Gln Asp Leu Gly Phe Pro Gly Ala Trp Arg Phe Gln Val  
210 215 220  
Ser Leu Glu Leu Pro Asp Pro His Pro Cys Leu Ser Val Cys Gln Gly  
225 230 235 240  
Asn Lys Gly Lys Leu Glu Val Ile Val Ser Ala Tyr Met His Tyr Ser  
245 250 255  
Lys Ile Ser Ala Gly  
260

【0203】

<210> 5  
<211> 615  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 5  
Met Glu Thr Ile Glu Lys Leu Gln Asn Asp Lys Ala Lys Leu Glu Val  
1 5 10 15  
Lys Ser Gln Thr Leu Glu Lys Glu Ala Lys Glu Cys Arg Leu Arg Thr  
20 25 30  
Glu Glu Cys Gln Leu Gln Leu Lys Thr Leu His Glu Asp Leu Ser Gly  
35 40 45  
Arg Leu Glu Glu Ser Leu Ser Ile Ile Asn Glu Lys Val Pro Phe Asn  
50 55 60  
Asp Thr Lys Tyr Ser Arg Tyr Asn Ala Leu Asn Val Pro Leu His Asn  
65 70 75 80  
Arg Arg His Gln Leu Lys Met Arg Asp Ile Ala Gly Gln Ala Leu Ala  
85 90 95  
Phe Val Gln Asp Leu Val Thr Ala Leu Leu Asn Phe His Thr Tyr Thr  
100 105 110  
Glu Gln Arg Ile Gln Ile Phe Pro Val Asp Ser Ala Ile Asp Thr Ile  
115 120 125  
Ser Pro Leu Asn Gln Lys Phe Ser Gln Tyr Leu His Glu Asn Ala Ser  
130 135 140  
Tyr Val Arg Pro Leu Glu Gly Met Leu His Leu Phe Glu Ser Ile  
145 150 155 160  
Thr Glu Asp Thr Val Thr Val Leu Glu Thr Thr Val Lys Leu Lys Thr  
165 170 175  
Phe Ser Glu His Leu Ser Tyr Ile Cys Phe Leu Arg Lys Ile Leu  
180 185 190  
Pro Tyr Gln Leu Lys Ser Leu Glu Glu Cys Glu Ser Ser Leu Cys  
195 200 205  
Thr Ser Ala Leu Arg Ala Arg Asn Leu Glu Leu Ser Gln Asp Met Lys  
210 215 220

Lys Met Thr Ala Val Phe Glu Lys Leu Glu Thr Tyr Ile Ala Leu Leu  
225 230 235 240  
Ala Leu Pro Ser Thr Glu Pro Asp Gly Leu Leu Arg Thr Asn Tyr Ser  
245 250 255  
Ser Val Leu Thr Asn Val Gly Ala Ala His Gly Phe His Asp Val  
260 265 270  
Met Lys Asp Ile Ser Lys His Tyr Ser Glu Lys Ala Ala Ile Glu His  
275 280 285  
Glu Leu Pro Thr Ala Thr Glu Lys Leu Ile Thr Thr Asn Asp Cys Ile  
290 295 300  
Leu Ser Ser Val Val Ala Ser Thr Asn Gly Ala Gly Lys Ile Ala Ser  
305 310 315 320  
Phe Phe Ser Asn Asn Leu Asp Tyr Phe Ile Ala Ser Leu Ser Tyr Gly  
325 330 335  
Pro Lys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Ser Pro Leu Ser Ala Glu Cys Met  
340 345 350  
Leu Glu Tyr Lys Lys Lys Ala Ala Tyr Met Lys Ser Leu Arg Lys  
355 360 365  
Pro Leu Leu Glu Ser Val Pro Tyr Glu Glu Ala Leu Ala Asn Arg Arg  
370 375 380  
Ile Leu Leu Ser Ser Thr Glu Ser Arg Glu Gly Leu Ala Glu Val  
385 390 395 400  
Glu Glu Ser Leu Glu Lys Ile Ser Lys Leu Glu Glu Lys Glu His  
405 410 415  
Trp Met Leu Glu Ala Glu Leu Ala Lys Ile Lys Leu Glu Lys Glu Asn  
420 425 430  
Glu Arg Ile Ala Asp Lys Leu Lys Asn Thr Gly Ser Ala Glu Leu Val  
435 440 445  
Gly Leu Ala Glu Asn Ala Val Ser Asn Thr Ala Gly Glu Asp  
450 455 460  
Glu Ala Thr Ala Lys Ala Val Leu Glu Pro Ile Glu Ser Thr Ser Leu  
465 470 475 480  
Ile Gly Thr Leu Thr Arg Thr Ser Asp Ser Glu Val Pro Asp Val Glu  
485 490 495  
Ser Arg Glu Asp Leu Ile Lys Asn Arg Tyr Met Ala Arg Ile Val Glu  
500 505 510  
Leu Thr Ser Glu Leu Glu Leu Ala Asp Ser Lys Ser Val His Phe Tyr  
515 520 525  
Ala Glu Cys Arg Ala Leu Ser Lys Arg Leu Ala Glu Lys Ser  
530 535 540  
Lys Glu Ala Leu Thr Glu Glu Met Lys Leu Ala Ser Glu Asn Ile Ser  
545 550 555 560  
Arg Leu Glu Asp Glu Leu Thr Thr Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Asp Glu  
565 570 575  
Leu Ser Met Met Ser Asp His Leu Cys Ser Met Asn Glu Thr Leu Ser  
580 585 590  
Lys Glu Arg Glu Glu Ile Asp Thr Leu Lys Met Ser Ser Lys Glu Asn  
595 600 605  
Ser Lys Lys Asn Lys Ser Arg

610  
<210> 6  
<211> 3168  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<221> CDS  
<222> (158) .. (2497)  
<400> 6  
aa gtagagga gtagagcgg cggcggcggc ggccggcgt ggcgtg gccagcagaga 60  
tactgcctga ccgttcccg agagcggtc tgggtttggg agcggagac aggcgggc 120  
gcctggcgg cctggcctgt acggggcgg agcggcc atg gcc tgg gct ggg ttg 175  
Met Ala Ser Ala Glu Leu  
1  
5  
cag ggg aag tac cag aag cgg gct cag ggg tac tgg aag ctt cgg gct 223  
Glu Gly Lys Tyr Glu Lys Leu Ala Glu Glu Tyr Ser Lys Leu Arg Ala  
10 15 20  
cag aat cag gtt cgg aaa aag ggt gtt ggg gat gaa caa gaa aat tct 271  
Glu Asn Glu Val Leu Lys Lys Gly Val Val Asp Glu Glu Ala Asn Ser  
25 30 35  
gaa gct tta aag ggg caa cgg aaa atg aag gat cag tca ttg aga aaa 319  
Ala Ala Leu Lys Glu Glu Lys Met Lys Asp Glu Ser Leu Arg Lys  
40 45 50  
cta caa cag gaa atg gac agt ttg aca ttt cga aat cgg cag ctt gcc 367  
Leu Glu Glu Met Asp Ser Leu Thr Phe Arg Asn Leu Glu Leu Ala  
55 60 65 70  
aag aag gta gaa cta ctt caa gat gaa cta gct cta agt gaa cca cga 415  
Lys Arg Val Glu Leu Glu Asp Glu Leu Ala Leu Ser Glu Pro Arg  
75 80 85  
ggc aag aaa aac aag aaa agt gga gaa tct tct cag ttg agt caa 463  
Gly Lys Lys Asn Lys Lys Ser Gly Glu Ser Ser Ser Glu Leu Ser Glu  
90 95 100  
gag cag aag agt gtc ttt gat gaa gat cgg caa aag aag ata gaa gag 511  
Glu Glu Lys Ser Val Phe Asp Glu Asp Leu Glu Lys Lys Ile Glu Glu  
105 110 115  
aat gaa cgg ttg cat ata caa ttt ttt gaa gct gat ggg cag cac aag 559  
Asn Glu Arg Leu His Ile Glu Phe Phe Glu Ala Asp Glu Glu His Lys  
120 125 130  
cat ggg gaa gca ggg cgg aag agt cga cgg gcc act cgg ggg aca gaa 607  
His Val Glu Ala Glu Leu Arg Ser Arg Leu Ala Thr Leu Glu Thr Glu  
135 140 145 150  
gaa gcc cag cac caa gct ggg gtt gac ggt ctc acc cgg aag tac atg 655  
Ala Ala Glu His Glu Ala Val Asp Gly Leu Thr Arg Lys Tyr Met  
155 160 165  
gaa acc att ggg aag cgg aac gac aag gct aaa cta gaa ggg aaa 703  
Glu Thr Ile Glu Lys Leu Glu Asn Asp Lys Ala Lys Leu Glu Val Lys  
170 175 180  
tct cag act cta gaa aag gaa gcc aag gaa tgt cga ctt cga acg gaa 751

[0204]

71 72

Ser Gln Thr Thr Leu Leu Lys Glu Ala Lys Glu Cys Arg Leu Arg Thr Glu  
185 190 195  
gaa tgt caa tta cag tta aag act ctt cat gaa gat tgg tca agt aga 799  
Glu Cys Gln Leu Leu Lys Thr Leu His Glu Asp Leu Ser Gly Arg  
200 205 210  
tta ggg gaa tcc tta atc atc aac gaa gaa gta cct ttt aat gat 847  
Leu Glu Glu Ser Leu Ser Ile Ile Asn Glu Lys Val Pro Phe Asn Asp  
215 220 225 230  
aca aaa tat agt cag tac aac gct cag aac gtt cca ctc aac aat agt 895  
Thr Lys Tyr Ser Gln Tyr Asn Ala Leu Asn Val Pro Leu His Asn Arg  
235 240 245  
aga cac cag cag atg atg cga gat att gct agt gaa cag gcc cag gct ttt 943  
Arg His Gln Leu Lys Met Arg Asp Ile Ala Gly Gln Ala Leu Ala Phe  
250 255 260  
glt cag gat ctt gtt agt gct ctt cta aac ttt cat acc tac aca gaa 991  
Val Gln Asp Leu Val Thr Ala Leu Leu Asn Phe His Thr Tyr Thr Glu  
265 270 275  
cag agt att caa att ttt ctt gtt gat tct gcc att gac act ata tct 1039  
Gln Arg Ile Gln Ile Phe Pro Val Asp Ser Ala Ile Asp Thr Ile Ser  
280 285 290  
cca ttg aat cag aag ttc tca caa tac ctt cat gaa aat ggt tcc tat 1087  
Pro Leu Asn Gln Lys Phe Ser Gln Tyr Leu His Glu Asn Ala Ser Tyr  
295 300 305  
gtc cgc cct ctt ggg gaa gga atg ctt cat tta ttt gaa agt atc act 1135  
Val Arg Pro Leu Glu Glu Gly Met Leu His Leu Phe Glu Ser Ile Thr  
310 315 320 325  
ggg gat act gtt gtt ggg aca act gtt aat ttg aat act ttt 1183  
Glu Asp Thr Val Thr Val Leu Glu Thr Thr Val Lys Leu Lys Thr Phe  
330 335 340  
tca gaa cnc tta acc tcc tac ata tgt ttt ctt agt aag att ctt ccc 1231  
Ser Glu His Leu Thr Ser Tyr Ile Cys Phe Leu Arg Lys Ile Leu Pro  
345 350 355  
tat cag tta aat agt tta gaa gaa gaa tgt gaa tcc tcc ctt tgc aca 1279  
Tyr Gln Leu Lys Ser Leu Glu Glu Cys Glu Ser Ser Leu Cys Thr  
360 365 370  
tct ggg tta aga gcc agt ant cta gag ctt tcc cag gac atg aaa aaa 1327  
Ser Ala Leu Arg Ala Arg Asn Leu Glu Leu Ser Gln Asp Met Lys Lys  
375 380 385  
atg aca gct gtt ttt ggg aag ctt cag act tac ata gct ctt ctt gcc 1375  
Met Thr Ala Val Phe Glu Lys Leu Gln Thr Tyr Ile Ala Leu Leu Ala  
395 400 405  
ttg cca agt aca ggg cca gat gga ctc ctt cgg aca aac tac agt tct 1423  
Leu Pro Ser Thr Glu Pro Asp Gly Leu Leu Arg Thr Asn Tyr Ser  
410 415 420  
gtg tta aca aat gtt agt gct ctt cag cat gga ttt cat gac gtt atg 1471  
Val Leu Thr Asn Val Gly Ala Ala Leu His Gly Phe His Asp Val Met  
425 430 435  
aaa gat att tcc naa cat tat agt cna aaa gct gca ata gac cat gaa 1519  
Lys Asp Ile Ser Lys His Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Ile Glu His Glu

73

74

440 445 450  
ctt cca aca gaa aca aag cag atg ata aca act aat gac tgt atc cttg 1567  
Leu Pro Thr Ala Thr Gln Lys Leu Ile Thr Thr Asn Asp Cys Ile Leu  
455 460 465 470  
tca tta gtt gaa tta aca aat gga gaa aag att gaa tcc ttc 1615  
Ser Ser Val Val Ala Leu Thr Asn Gly Ala Gly Lys Ile Ala Ser Phe  
475 480 485  
ttc agc aac aat ttg gac tac ttc att gct tca ctt agc tat gga cct 1663  
Phe Ser Asn Asn Leu Asp Tyr Phe Ile Ala Ser Leu Ser Tyr Gly Pro  
490 495 500  
aag gaa ggg agt gga ttc att agt cct ctt tca gct gaa agc atg cta 1711  
Lys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Ser Pro Leu Ser Ala Glu Cys Met Leu  
505 510 515  
cag tac aag aaa aaa gct gct gcc tat atg aag tct ttg aga aag ccc 1759  
Gln Tyr Lys Lys Lys Ala Ala Tyr Met Lys Ser Leu Arg Lys Pro  
520 525 530  
ctc ttg ggg tct gtt cct tat gaa gaa ctt gaa aac cgc cgc atc 1807  
Leu Leu Glu Ser Val Pro Tyr Glu Glu Ala Leu Ala Asn Arg Arg Ile  
535 540 545  
ctt ctc agc tct act gaa agt cga gaa ggc ctt gaa cag aat gtt caa 1855  
Leu Leu Ser Ser Thr Glu Ser Arg Glu Gly Leu Ala Gln Gln Val Gln  
555 560 565  
cag agt ttg gaa aag att tct aca ctt ggg cag gaa aaa gaa cat tgg 1903  
Gln Ser Leu Glu Lys Ile Ser Lys Leu Glu Gln Glu Lys Glu His Trp  
570 575 580  
atg ttg gaa gaa caa tta gcc aac atc aag cta gag aaa gaa aac cag 1951  
Met Leu Glu Ala Gln Leu Ala Lys Ile Lys Leu Glu Lys Glu Asn Gln  
585 590 595  
cga att gca gat aag ctt agt aat aca agt agt gcc cag ctt gtt agt 1999  
Arg Ile Ala Asp Lys Leu Lys Asn Thr Gly Ser Ala Gln Leu Val Gly  
600 605 610  
ctg gcc cag gaa aat gct gtt gtt tca aat act gct ggc cag gat gaa 2047  
Leu Ala Gln Glu Asn Ala Ala Val Ser Asn Thr Thr Ala Gly Gln Asp Glu  
615 620 625 630  
gcc aca gct aag gct gtt gtt gaa ccc att cag agc aac agt cta att 2095  
Ala Thr Ala Lys Ala Val Leu Glu Pro Ile Gln Ser Thr Ser Leu Ile  
635 640 645  
ggg act tta acc agt aca tct gaa agt ggg gtt cca gat gtt gaa tct 2143  
Gly Thr Leu Thr Arg Thr Ser Asp Ser Glu Val Pro Asp Val Glu Ser  
650 655 660  
cgt gaa gaa tta att aaa aat caa tac atg gaa agt ata gtt gaa ctt 2191  
Arg Glu Asp Leu Ile Lys Asn His Tyr Met Ala Arg Ile Val Glu Leu  
665 670 675  
aag tct cag ttg cag ctt gct gac agt aag tca gtt cat ttt tct gcc 2239  
Thr Ser Gln Leu Gln Leu Ala Asp Ser Lys Ser Val His Phe Tyr Ala  
680 685 690  
ggg tgc cga gaa ctt tct aaa agc ctt gct gaa aag tct aag 2287  
Glu Cys Arg Ala Leu Ser Arg Leu Leu Ala Glu Lys Ser  
695 700 705 710

76 78  
 gaa gen ttg aca gaa atg aac att gcc agt cag aac atc agc aga 2335  
 Glu Ala Thr Glu Glu Met Lys Leu Ala Ser Gln Asn Ile Ser Arg  
 715 720 725  
 ctt cag gat gag ctg aca act acc aag aag agt tac gag gat cag tta 2383  
 Leu Gln Asp Glu Leu Thr Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Asp Gln Leu  
 730 735 740  
 agt atg atg agt gac cac ctg tgc agc atg aat gag aca tta tct aua 2431  
 Ser Met Met Ser Asp His Leu Cys Ser Met Asn Glu Thr Leu Ser Lys  
 745 750 755  
 cag aga gaa gag att gac aca cta aag atg tcc agt aag aag aat tct 2479  
 Gln Arg Glu Glu Ile Asp Thr Leu Lys Met Ser Lys Gly Asn Ser  
 760 765 770  
 aua aag aac aag agt cga tagtttga aatagctggtt ggcgacigt 2527  
 Lys Lys Asn Lys Ser Arg  
 775 780  
 ctttcacgac ctgtctctgc tgcacagagc gcaaggagctg agacacgctc catgtctgct 2587  
 gctcttggga agctaaagta ttgttgacc tagtaacta gtacgtgtg gaaaggcct 2647  
 tgaattatt aaacataatt tgaacagct gaggcaata cagaagtga tgcggcagt 2707  
 aaaganna caatcgtat gtacgtgata ttgttggtt ccttaactg ttttactgt 2767  
 gacatttta aaattgggt ttaatttcg taigtangaa caaatatttt gtatacttc 2827  
 aaacataat atalggtat cgaattgta tctatggtat agatatgt tcttganna 2887  
 aaagctaa atgtcnaac tgcatactt tctatata gttagagcca ttctcagat 2947  
 tctttttaa agattgttc aattctctt cctctctct cctctctct cctctctct 3007  
 cctctctct tctctctg gggaggggag cctccaac ttacagctt gtgggttag 3067  
 tatctatc ttacgtctt tgcatactg tgcatactg atagctaaag gaagttag 3127  
 tcaataatt catactata tcaaaaaa aaaaaaaaa a 3168  
 < 210> 7  
 <211> 1740  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (49) ... (507)  
 <400> 7  
 atcaacggcn ttgattgac caatttaagt caacagtgag cagttgcn atg ctg aua 57  
 Met Leu Lys  
 1  
 gcc agt gcc ggc tcc cct gct gtt gcc ctt aua gcn ctt gag gtc cag 105  
 Ala Ser Ala Ala Ser Pro Ala Val Ala Leu Lys Ala Leu Glu Val Gln  
 5 10 15  
 att gtt gag gng ggc act cag aac ggc gng gng cag cag agt act ttc 153  
 Ile Val Glu Glu Ala Thr Asn Ala Glu Glu Gln Pro Ser Thr Phe  
 20 25 30 35  
 agc gaa aat gag tat gcc agt tgg tcc cca tta tgg gtc atg tgg 201  
 Ser Glu Asn Glu Tyr Asp Ala Ser Trp Pro Ser Trp Val Met Trp  
 40 45 50  
 ctt ggg ctt ccc agc aca ctt cat agc tgc cac gat ata gtt tta cga 249

[0205]

[0206]

77 78  
 Leu Gly Leu Pro Ser Thr Leu His Ser Cys His Asp Ile Val Leu Arg  
 55 60 65  
 aga agt tac ttg gga agt tgg ggc ttt agt atc gtt ggt gga tat gaa 297  
 Arg Ser Tyr Leu Gly Ser Trp Gly Phe Ser Ile Val Gly Gly Tyr Glu  
 70 75 80  
 gag aac cac acc aat cag cct ttt ttc att aua act att gtc ttg gga 345  
 Glu Asn His Thr Asn Gln Pro Phe Phe Ile Lys Thr Ile Val Leu Gly  
 85 90 95  
 act cct gat tat tat gat gga aga tta aag tgt ggt gac atg att gtc 393  
 Thr Pro Ala Tyr Tyr Asp Gly Arg Leu Lys Cys Gly Asp Met Ile Val  
 100 105 110 115  
 gcc gta aat ggg ctg tca acc gtc ggc atg agc cac tct gaa cta gtt 441  
 Ala Val Asn Gly Leu Ser Thr Val Gly Met Ser His Ser Ala Leu Val  
 120 125 130  
 ccc atg ttg aag gag cag agg aac aua gtc act ctg acc gtt att tgt 489  
 Pro Met Leu Lys Glu Gln Arg Asn Lys Val Thr Leu Thr Val Ile Cys  
 135 140 145  
 tgg cct ggc agc ctt gta t agatttgg aaattggtt caattctgc 537  
 Trp Pro Gly Ser Leu Val  
 150  
 aatctctctt tttagatttt tgaagaaaa cctttggtt tcatgtgtt tgggttag 597  
 ggcgtcga cactgtggt atacaagg88 cnaaacca ctaagtatgt cgttttgt 657  
 ttaattaat ggttcttaa gttagtcaa ttcttttag cttagaaca gttctcaact 717  
 aaatttgg agttatatt ttgaattc agactagt gttaaatgt taacttctt 777  
 aatggcaaa gtcaaccaaa acgtgccc agatggagta aagacctctt ggtgggtct 837  
 tgttttgt aactgaataa tagnaagat tcatatccc ttaggcctga tgcagcaaa 897  
 gcagtaaca acagtgta ctgcactgt tcaacctat accatgaig aatatactt 957  
 aaatttgggt gataactgt cccattttt tttagaact agtctcagc ctgggtgag 1017  
 ggcagagcc ctgtctaaa aaaaaaaaa aaagacctt gtcctttta tatacaag 1077  
 ccccaaacg caacagcaa ctctgtgtt gcttaacaga ggaagacagt ctgtctaaa 1137  
 gctggtagaa aagtggcca gtgggaccc tgaagaaan taigtctg tctgtgttt 1197  
 gcttaacten gtagattca agggcaatt tgaanaigt taattttgc taftgggtt 1257  
 aactataga ttctagcag cgtcaacata cctagatgat cttctctgc ctctactcc 1317  
 agtactgatt taatcatctt aatttttat ttftgaag agtctcttt tacaigtctt 1377  
 atgtatagt ctgtctataa gatacaat tcaigtaaa gtctcagta tgcacagt 1437  
 ttgtttttg ttcaactctt caaacaggtt aacactttt gtactgata tgcattcca 1497  
 ggtttctct acicaaatat ttaaaagc aaattcttt tttttaaaa ttcttctt 1557  
 gtttctate tgaanagat catactaaa cacagctttt aaanacttta tcttttgt 1617  
 tttttgttt tttttagac ggcgtctggc tctgttccc aggttgcagt ggcagagat 1677  
 cgtgcactgt cacttagcc tgggtcag agcauctc tgggtcaaa aaaaaaaaa 1737  
 aua  
 1740  
 <210> 8  
 <211> 1574  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS

19 80  
 <222> (22) .. (939)  
 <400> 8  
 ggagcgtttt ggagagaaa g atg gca gcc ccc ata cct cca ggg ttc tct 51  
 Met Ala Ala Pro Ile Pro Gln Gly Phe Ser 10  
 1  
 tgt tta tgg agc ttt ttt ggc tgg ttt cgg cag cca gtt ctg gtg 99  
 Cys Leu Ser Arg Phe Leu Gly Trp Phe Arg Gln Pro Val Leu Val 25  
 15  
 act cag tcc gca gct att gtt cca gta agc act aaa aaa cgt ttc aca 147  
 Thr Gln Ser Ala Ala Ile Val Pro Val Arg Thr Lys Lys Arg Phe Thr 40  
 30  
 cct cct att tat cca cct aaa ttt aaa gaa aag gng ttt atg cca 195  
 Pro Pro Ile Gln Pro Lys Phe Lys Thr Gln Lys Gln Phe Met Gln 55  
 45  
 cat gcc cgg aaa gca gga ttt gtt att cct cca gaa aaa tgg gcc cgt 243  
 His Ala Arg Lys Ala Gly Leu Val Ile Pro Pro Gln Lys Ser Asp Arg 70  
 60  
 tcc ata cat ctg gcc tgt aca gct ggt ata ttt ggt gcc tat gtt cct 291  
 Ser Ile His Leu Ala Cys Thr Ala Gly Ile Phe Asp Ala Tyr Val Pro 85  
 75  
 cct gng ggt gat gca cgc ata tca tct ctt tca aag gng gng ctg ata 339  
 Pro Gln Gly Asp Ala Arg Ile Ser Ser Leu Ser Lys Gln Gly Leu Ile 100  
 95  
 gng aga act gaa cga atg aag aag act atg gca tca cca gtg tca atc 387  
 Gln Arg Thr Gln Arg Met Lys Lys Thr Met Ala Ser Gln Val Ser Ile 110  
 115  
 cgg agg ata aaa gaa tat gat gcc aac ttt aaa ata aag gcc ttc cct 435  
 Arg Arg Ile Lys Asp Tyr Asp Ala Asn Phe Lys Ile Lys Asp Phe Pro 125  
 130  
 gga aat gct aag gat atc ttt att gaa gct cac ctt tgt cta aat aac 483  
 Gly Lys Ala Lys Asp Ile Phe Ile Gln Ala His Leu Cys Leu Asn Asn 140  
 145  
 tca gcc cat gac cga ctt cat acc ttt gta act gaa cca cgt ttt cca 531  
 Ser Asn His Asp Arg Leu His Thr Leu Val Thr Gln His Cys Phe Pro 155  
 160  
 gac atg act tgg gcc atc aat aat aag acc gtc cgc tgg agc ttt gtg 579  
 Asp Met Thr Trp Asp Ile Lys Tyr Lys Thr Val Arg Trp Ser Phe Val 175  
 180  
 gaa tct tta gng ccc tct cat gtt gtt cca gtt cgc tgt tca ag t atg 627  
 Gln Ser Leu Gln Pro Ser His Val Val Gln Val Arg Cys Ser Ser Met 190  
 195  
 atg aac cag ggc aac gtg tnc ggc cag atc acc gta cgc atg cca acc 675  
 Met Asn Gln Cys Val Tyr Gly Gln Ile Thr Val Arg Met His Thr 205  
 210  
 cgg cag act ctg gcc atc tat gac cgg ttt ggc ttt gtt atg tat gga 723  
 Arg Gln Thr Leu Ala Ile Tyr Asp Arg Phe Gly Arg Leu Met Tyr Gly 220  
 225  
 cag gaa gat gta ccc aag gat gtc ctg gng tat gtt gta ttc gaa aag 771  
 230

81 82  
 Gln Gln Asp Val Pro Lys Asp Val Leu Gln Tyr Val Val Phe Gln Lys 235  
 240  
 cag ttg aca aac ccc tat gga agc tgg aga atg cat acc aag atc gtt 819  
 Gln Leu Thr Asn Pro Tyr Gly Ser Trp Arg Met His Thr Lys Ile Val 255  
 260  
 ccc cca tgg gca ccc cct aag cag ccc atc ctt aag aag gtg atg atc 867  
 Pro Pro Trp Ala Pro Pro Lys Gln Pro Ile Leu Lys Thr Val Met Ile 270  
 275  
 cct ggc cct cag ctg aaa cca gaa gaa tat gaa gng gca cca gga 915  
 Pro Gly Pro Gln Leu Lys Pro Gln Gln Tyr Gln Ala Gln Gln Gly 285  
 290  
 gng gcc cag aag cct cag cta gcc tggagaaa atgacttct agggtagc 969  
 Gln Ala Gln Lys Pro Gln Leu Ala 300  
 305  
 ctgggtgag aggtctgg agctttgaa gtctccatt cctctcagc tataaaga 1029  
 actactttg ttctctcca tctgctong gtctttctg cagctcacc atcagcacc 1089  
 atgactgag actgggccc agcggggc aggtatcaa tggcctgga cactcttct 1149  
 tttaaatatt taigtctagc ttctgagctc agatgaaga cagtaigtct cagagacat 1209  
 tggatatong tttttccccc agcaggggact gtagagaca accagcaga tctctttgt 1269  
 aatcagaagg caggagatcag agttgaaat gnaatggt cagggtgtt gnaaatatt 1329  
 ggtgagttct gcaatttcc cctggttong gctgggong gacagcct cagatggcag 1389  
 aagtggaaga tggcctact tggagcgt gtagctttaa ggaatgagg actggggag 1449  
 aantatgt gtttataga catttaagng ggccttttc atatacagc tcaatgaa 1509  
 atcagcattt gctatttng gaaatatata atgcaaga aantatttaa aaaaaaaa 1569  
 aaaaa 1574  
 <210> 9  
 <211> 1368  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (55) .. (837)  
 <400> 9  
 agctctcagg cctgggaca gctgtgagg aaggagaca gaccaggag agcc atg 57  
 Met  
 aag cct agg aaa gct gag cct cat agc ttc cgg gag aag gtt ttc cgg 105  
 Lys Pro Arg Lys Ala Gln Pro His Ser Phe Arg Gln Lys Val Phe Arg 15  
 5  
 aag aaa cct cca gtc tgt gca gta tgt aag gtg acc atc gat ggg aca 153  
 Lys Lys Pro Pro Val Cys Ala Val Cys Lys Val Thr Ile Asp Gly Thr 20  
 25  
 ggc gtt tgg tgc aga gtc tgc aag gtg ggc agc cac aga aaa tgc gaa 201  
 Gly Val Ser Cys Arg Val Cys Lys Val Ala Thr His Arg Lys Cys Gln 35  
 40  
 gca aag gtg act tca gcc tgt cag gcc ttg ccc gtg gng ttt cgg 249  
 Ala Lys Val Thr Ser Ala Cys Gln Ala Leu Pro Pro Val Gln Leu Arg 55  
 60  
 65

[ 0 2 0 7 ]

84

cga aac aag gcc cca gtc aag cgc ata gag cac ctg gga tcc acc aaa 297  
 Arg Asn Thr Ala Pro Val Arg Arg Ile Glu His Leu Ciy Ser Thr Lys  
 70 75 80  
 tct ctg aac cac tca aag cag cgc aac ctg ccc aag aac ttc aac 345  
 Ser Leu Asn His Ser Lys Cln Arg Ser Thr Leu Pro Arg Ser Phe Ser  
 85 90 95  
 ctg gac cgc ctg atg gag cgg cgc tgg gac tta gac ctc acc tac gtc 393  
 Leu Asp Pro Leu Met Glu Arg Arg Trp Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Val  
 100 105 110  
 aag gag cgc atc tlg gcc gcc gcc ttc ccc gcc cgg ccc gcc gaa cag 441  
 Thr Glu Arg Ile Leu Ala Ala Phe Pro Ala Arg Pro Asp Glu Cln  
 115 120 125  
 cgg cnc cgg ggc cgc ctg cgc gag ctg gcc cat gtc ctg cca tcc aag 489  
 Arg His Arg Ciy His Leu Arg Glu Leu Ala His Val Leu Cln Ser Lys  
 130 135 140 145  
 cnc cgg gac aag tac ctg ctc ttc aac ctt tca gag aac aag cat gac 537  
 His Arg Asp Lys Tyr Leu Leu Phe Asn Leu Ser Glu Lys Arg His Asp  
 150 155 160  
 ctg acc cgc tta aac ccc aag gtc cca gac ttc ggc tgg cct gag ctg 585  
 Leu Thr Arg Leu Asn Pro Lys Val Cln Asp Phe Ciy Trp Pro Glu Leu  
 165 170 175  
 cat gct cca ccc ctg gcc ctg tgc tcc atc tgc aac gcc atg gag 633  
 His Ala Pro Pro Leu Asp Lys Leu Cys Ser Ile Cys Lys Ala Met Glu  
 180 185 190  
 aca tgg ctc agt gct gac cca cag cag gtc gta cta tac tgc aag 681  
 Thr Trp Leu Ser Ala Asp Pro Cln His Val Val Leu Tyr Cys Lys  
 195 200 205  
 gtc ggc cag gac ctc ggg ttc cct ggc tgg aag ttc cag gtc aac 729  
 Val Ciy Cln Asp Leu Ciy Phe Pro Ciy Ala Trp Arg Phe Cln Val Ser  
 210 215 220  
 ctg gag ctc cca gac cct cat ccc tgc ctc tct gtc tgc cng gga aac 777  
 Leu Glu Leu Pro Asp Pro His Pro Cys Leu Ser Val Cys Cln Ciy Asn  
 230 235 240  
 aag ggc aag ctt ggg gtc atc gtt tct gcc tac aig ccc tac aac aag 825  
 Lys Ciy Lys Leu Ciy Val Ile Val Ser Ala Tyr Met His Tyr Ser Lys  
 245 250 255  
 atc tct gca ggg tgggtccc aggcctgag tagctgttc cccgtggcc 877  
 Ile Ser Ala Ciy  
 260  
 cttctcag ctggccctt aggaaccat cttccctggg gccaccctct tegttagag 937  
 tcttttgt tngcttggc acttccact ccttttacc actagtactg caactagtgc 997  
 tgcagagat ggtctgaga gtttctggg ggcgcacaa accgggtggg gtaaacagt 1057  
 ggaatgggc cgggtggt ggttggctgacg tgaatacca gcactttggg aggtgggt 1117  
 gggcgggta ccgggggcca ggggttggg actagctgg ccgggggaaa cccctctct 1177  
 accaaataa taanaataa aanaatagct ggggtggg gggggtgact gtaaccag 1237  
 cttctcggg ggttgggcca ggggaatgct ttgaaccag gggcgggg ttgngtgg 1297  
 cccctcgggt accctgtac tccagctgg gggcgggt ggtcctcgt ctaaaaaa 1357  
 aaaaaaaaaa

88

<210> 10  
 <211>  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (180)... (2004)  
 <400> 10  
 gcaaaagaa tagaagaaa tgaacgggttg catacaaat ttttgaagc tgaigacag 60  
 caaaagatg tgaagagaa gctgaggagt cgaatggcca ccttgagac agaaagacc 120  
 cagcaacaag ctgtaggtga cgggtctacc cgggaagac atg gaa acc att gag 174  
 Met Glu Thr Ile Glu  
 1  
 aag ctg cag aac gac aag gct aac cta gag gtc aac tct cag act cta 222  
 Lys Leu Cln Asn Asp Lys Ala Lys Leu Glu Val Lys Ser Cln Thr Leu  
 10 15 20  
 gaa aag gaa gcc aag gaa tgt cga ctt cga aag gaa gaa tgt cca tta 270  
 Glu Lys Glu Ala Lys Glu Cys Arg Leu Arg Thr Glu Glu Cys Cln Leu  
 25 30 35  
 cag tta aag act ctt cat gaa gat tgg tca ggt aga tta gag gaa tcc 318  
 Cln Leu Lys Thr Leu His Glu Asp Leu Ser Ciy Arg Leu Glu Cln Ser  
 40 45 50  
 tta tca atc atc aat gaa aac gta cct ttt aat gat aca aac tat aat 366  
 Leu Ser Ile Ile Asn Glu Lys Val Pro Phe Asn Asp Thr Lys Tyr Ser  
 55 60 65  
 cgg tac aac gct ctg aac gtc cca ctc cca aat aag aag cac cag ctg 414  
 Arg Tyr Asn Ala Leu Asn Val Pro Leu His Asn Arg Arg His Cln Leu  
 70 75 80  
 aag atg cga gat att gct ggg cag gcc ctg gct ttt gtt cng gat ctt 462  
 Lys Met Arg Asp Ile Ala Ciy Cln Ala Leu Ala Phe Val Cln Asp Leu  
 90 95 100  
 gtc aag gct ctt cta aac ttt cat acc tac aca gaa cag aag att caa 510  
 Val Thr Ala Leu Leu Asn Phe His Thr Tyr Thr Glu Cln Arg Ile Cln  
 105 110 115  
 att ttt cct gtt gat tcc gcc att gac act ata tcc cca ttt aat cag 558  
 Ile Phe Pro Val Asp Ser Ala Ile Asp Thr Ile Ser Pro Leu Asn Cln  
 120 125 130  
 aag ttc tca cca tac ctt cat gaa aat ggc tcc tac gtc cgc cct ctt 606  
 Lys Phe Ser Cln Tyr Leu His Glu Asn Ala Ser Tyr Val Arg Pro Leu  
 135 140 145  
 gag gaa gga atg ctt cat tta ttt gaa agt atc act gag gat act gtc 654  
 Glu Glu Ciy Met Leu His Leu Phe Glu Ser Ile Thr Glu Asp Thr Val  
 150 155 160 165  
 act gtc tgg gag aca act gtc aag ttt aac act ttt tca gaa cnc tta 702  
 Thr Val Leu Glu Thr Thr Val Lys Leu Lys Thr Phe Ser Glu His Leu  
 170 175 180  
 acc tcc tca ata tgt ttt ctt aag aag att ctt ccc tat cag tta aac 750  
 Thr Ser Tyr Ile Cys Phe Leu Arg Lys Ile Leu Pro Tyr Tyr Leu Lys

185 190 195  
 agt tta gaa gaa tgt gaa tcc tct ctt tgc aca tct gcg tta aga 798  
 Ser Leu Glu Glu Cys Glu Ser Ser Leu Cys Thr Ser Ala Leu Arg  
 200 205 210  
 gcc agt aat cta gag ctg tcc cag gac atg aaa aaa atg aca gct gtg 846  
 Ala Arg Asn Leu Leu Ser Glu Asp Met Lys Lys Met Thr Ala Val  
 215 220 225  
 ttt gag aag ctg cag aac tac ata gct ctt ctt gcc tlg cca agt aca 894  
 Phe Glu Lys Leu Glu Thr Tyr Ile Ala Leu Leu Ala Leu Pro Ser Thr  
 230 235 240 245  
 gag cca gat gag ctg ctt cgg aca aac tac agt tct gtg tta aca aat 942  
 Glu Pro Asp Gly Leu Leu Arg Thr Asn Tyr Ser Ser Val Leu Thr Asn  
 250 255 260  
 gtt agt gct gct ctg ctt gga ttt cat gac gtt atg aca gat att tcc 990  
 Val Gly Ala Ala Leu His Gly Phe His Asp Val Met Lys Asp Ile Ser  
 265 270 275  
 aaa cat tat agt aca aaa gct gca ata gag cat gaa ctt cca aca gca 1038  
 Lys His Tyr Ser Glu Lys Ala Ala Ile Glu His Glu Leu Pro Thr Ala  
 280 285 290  
 aca cag aag ctg ata aca aat aat gac tgc atc ctg tca tca gta gtg 1086  
 Thr Glu Lys Ile Thr Thr Asn Asp Cys Ile Leu Ser Ser Val Val  
 295 300 305  
 gca tca aca nat gga gca gga aag att gca tcc ttc ttc agc aac aat 1134  
 Ala Ser Thr Asn Gly Ala Gly Lys Ile Ala Ser Phe Ser Asn Asn  
 310 315 320 325  
 tlg gac taa ttc att gct tca ctg agc tat gga cct aag gca gcg agt 1182  
 Leu Asp Phe Ile Ala Ser Leu Ser Tyr Gly Pro Lys Ala Ala Ser  
 330 335 340  
 gga ttc att agt cct tca gct gaa tgc atg cta cag tat aag aca 1230  
 Gly Phe Ile Ser Pro Leu Ser Ala Glu Cys Met Leu Glu Tyr Lys Lys  
 345 350 355  
 aaa gct gct gcc tat atg aag tct tlg gga aag ccc ctc tlg gag tct 1278  
 Lys Ala Ala Tyr Met Lys Ser Leu Arg Lys Pro Leu Leu Glu Ser  
 360 365 370  
 gta cct tat gaa gaa gca ctg gca aac agc agc atc ctt ctc agc tct 1326  
 Val Pro Tyr Glu Glu Ala Leu Ala Asn Arg Arg Ile Leu Leu Ser Ser  
 375 380 385  
 act gaa agt cga gaa ggc ctt gca cag caa gtt caa cag agt tlg gaa 1374  
 Thr Glu Ser Arg Glu Glu Leu Ala Glu Glu Val Glu Glu Ser Leu Glu  
 390 395 400 405  
 aag att tct aca ctg gag cag gaa aca gaa cat tgg atg tlg gaa gca 1422  
 Lys Ile Ser Lys Leu Glu Glu Glu Lys Glu His Trp Met Leu Glu Ala  
 410 415 420  
 caa tta gcc aca atc aag cta gag aca gaa aac cag cga att gca gat 1470  
 Glu Leu Ala Lys Ile Lys Leu Glu Lys Glu Asn Glu Arg Ile Ala Asp  
 425 430 435  
 aag ctg aag nat aca ggt agt gcc cag ctg gtt gga ctg gcc cag gaa 1518  
 Lys Leu Lys Asn Thr Gly Ser Ala Glu Glu Val Val Gly Leu Ala Glu  
 440 445 450  
 nat gct gct gtg tca nat aat gct ggc cag gat gaa gcc aca gct aag 1566

Asn Ala Val Ser Asn Thr Ala Gly Glu Asp Glu Ala Thr Ala Lys 90  
 455 460 465  
 get gtg tlg gag ccc att cag agc acc agt cta att ggg act tta acc 1614  
 Ala Val Leu Glu Pro Ile Glu Ser Thr Ser Leu Ile Gly Thr Leu Thr  
 470 475 480 485  
 agg aca tct gac agt gag gtt cca gat gtg gaa tct cgt gaa gac tta 1662  
 Arg Thr Ser Asp Ser Glu Val Pro Asp Val Glu Ser Arg Glu Asp Leu  
 490 495 500  
 att aca aat cgc tac atg gca agg ata gtg gaa ctt agc tct cag tlg 1710  
 Ile Lys Asn Arg Tyr Met Ala Arg Ile Val Glu Leu Thr Ser Glu Leu  
 505 510 515  
 cag ctg gct gac agt aag tca gtg cat ttt tat gcc gag tgc cga gca 1758  
 Glu Leu Ala Asp Ser Lys Ser Val His Phe Tyr Ala Glu Cys Arg Ala  
 520 525 530  
 ctg tct aca aga ctg gcc tlg gct gaa aag tct aag gaa gca tlg aca 1806  
 Leu Ser Lys Arg Leu Ala Leu Ala Glu Lys Ser Lys Glu Ala Leu Thr  
 535 540 545  
 gaa gaa atg aca ctt gcc agt cag aac atc agc aga ctt cag gat gag 1854  
 Glu Glu Met Lys Leu Ala Ser Glu Asn Ile Ser Arg Leu Glu Asp Glu  
 550 555 560 565  
 ctg aca act acc aag agg agt tac gag gat cag tta agt atg atg agt 1902  
 Leu Thr Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Asp Glu Leu Ser Met Met Ser  
 570 575 580  
 gac aca ctg tgc agc atg aat gag aca tta tct aca cag aga gaa gag 1950  
 Asp His Leu Cys Ser Met Asn Glu Thr Leu Ser Lys Glu Arg Glu Glu  
 585 590 595  
 att gac aca cta aag atg tcc agt aag ggg aat tct aca aag aac aag 1998  
 Ile Asp Thr Leu Lys Met Ser Lys Gly Asn Ser Lys Lys Asn Lys  
 600 605 610  
 agt cga tagtttgaa atagctggtt ggcgcctgtt ctttcagac ctgcctcgc 2054  
 Ser Arg  
 615  
 tgcacagac cgcaggctg agcacagtc catgcctgct gccttcagga agctaaaga 2114  
 ttttggacc tagtaacta gtacgtgtg gaaagcgt tgaatattt aaacatatt 2174  
 tgaacagc gggcaata cagaagttga tgcggcgt aaatggaaa caatcgtat 2234  
 gtaaggata ttgtaggttt ccttagctg tttttactgt gaactttta aaataggtt 2294  
 ttaattcag tatgtaaa caaatatttt gtatcttc aaactcaatt atatgtaat 2354  
 cgatttgga tcaatggat agataigtgt tcttgaaa aaaaaaaa aaaa 2408

[0209]

<210> 11  
 <211> 30  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> an artificially synthesized oligo-cap linker sequence  
 <400> 11  
 agcaugagau cggccuuguu ggcucucugg 30

[0210]

90

(47)

(48)

91

92

93

94

<210> 12

<210> 12

<210> 12

<211> 42

<211> 42

<211> 42

<212> DNA

<212> DNA

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<213> Artificial Sequence

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<220>

<223> an artificially synthesized oligo(df) primer sequence

<223> an artificially synthesized oligo(df) primer sequence

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

<400> 12

<400> 12

ggggctggag acggcctatg tggccttttt ttttttttt tt

ggggctggag acggcctatg tggccttttt ttttttttt tt

ggggctggag acggcctatg tggccttttt ttttttttt tt

<210> 13

<210> 13

<210> 13

<211> 21

<211> 21

<211> 21

<212> DNA

<212> DNA

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<213> Artificial Sequence

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<223> an artificially synthesized primer sequence

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 13

<400> 13

<400> 13

agcctcgggt cggcctgttt g

agcctcgggt cggcctgttt g

agcctcgggt cggcctgttt g

<210> 14

<210> 14

<210> 14

<211> 21

<211> 21

<211> 21

<212> DNA

<212> DNA

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<213> Artificial Sequence

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<223> an artificially synthesized primer sequence

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

<400> 14

<400> 14

ggggctggag acggcctatg t

ggggctggag acggcctatg t

ggggctggag acggcctatg t

<210> 15

<210> 15

<210> 15

<211> 10

<211> 10

<211> 10

<212> DNA

<212> DNA

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<213> Artificial Sequence

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<220>

<223> an artificially synthesized NF-kappaB-binding site sequence

<223> an artificially synthesized NF-kappaB-binding site sequence

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

<400> 15

<400> 15

gggaattcc

gggaattcc

gggaattcc

<210> 10

<210> 10

<210> 10

<211> 22

<211> 22

<211> 22

<212> DNA

<212> DNA

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<213> Artificial Sequence

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<223> an artificially synthesized primer sequence

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

<400> 16

<400> 16

atctactaca tgggaaggat ag

atctactaca tgggaaggat ag

atctactaca tgggaaggat ag

<210> 17

<210> 17

<210> 17

<211> 21

<211> 21

<211> 21

<212> DNA

<212> DNA

<212> DNA

[0211]

[0216]

[0212]

[0217]

[0218]

[0219]

[0214]

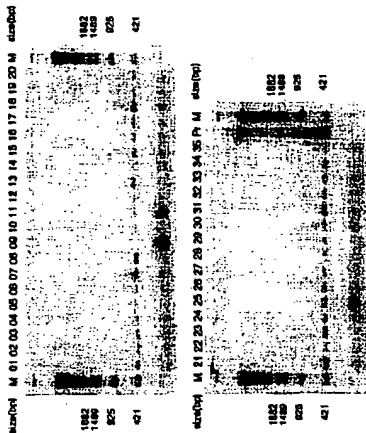
[0220]

[0215]

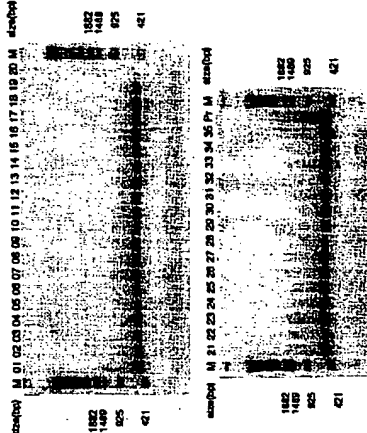
[0220]



【図2】



【図3】



【0221】

<210> 23  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence  
<400> 23  
gttcgaagca tctctcgcc

20

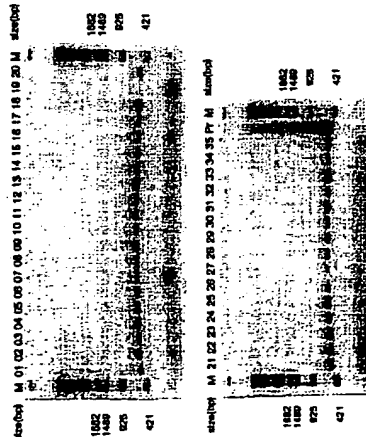
【図面の簡単な説明】

【図1】は、PCR法を用いて、35個のヒト組織（臓器）におけるCOL03279転写物の発現量を調べた結果である。  
【図2】は、PCR法を用いて、35個のヒト組織（臓器）におけるCOL06772転写物の発現量を調べた結果である。  
【図3】は、PCR法を用いて、35個のヒト組織（臓器）におけるADKA01604転写物の発現量を調べた結果である。  
【図4】は、PCR法を用いて、35個のヒト組織（臓器）におけるADS00701転写物の発現量を調べた結果である。

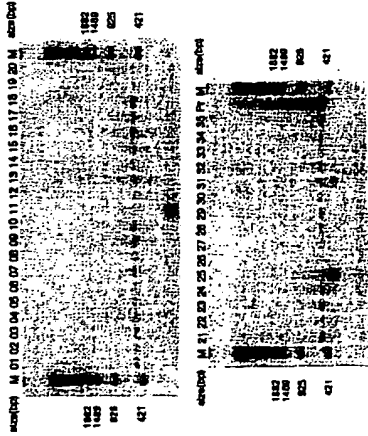
【符号の説明】

全図中に記載の数字、英字は以下の通りである。  
01：脳、02：脳、03：尾状核、04：海馬、05：黒質、06：視床、07：腎臓、08：脾臓、09：脳下垂体、10：小腸、11：骨髄、12：膵臓、13：小腸、14：膵臓、15：胎児腎臓、16：胎児腎臓、17：胎児肝臓、18：胎児脾臓、19：心臓、20：肝臓、21：肺、22：リンパ節、23：腎臓、24：胎盤、25：前立腺、26：唾液腺、27：骨格筋、28：腎臓、29：脾臓、30：胃、31：膵臓、32：膵臓、33：甲状腺、34：気管、35：子宮、P：プラスミド、M：分子重量マーカー

【図1】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.

A 61 K 39/395

A 61 P 48/00

A 61 P 3/10

A 61 P 9/04

A 61 P 9/10

A 61 P 11/00

A 61 P 11/02

A 61 P 11/04

A 61 P 11/06

A 61 P 13/12

A 61 P 17/06

A 61 P 19/02

A 61 P 19/08

A 61 P 31/00

A 61 P 31/12

A 61 P 31/18

A 61 P 35/00

A 61 P 35/02

A 61 P 37/04

A 61 P 37/08

A 61 P 43/00

A 61 P 14/47

A 61 P 16/18

A 61 P 16/18

A 61 P 16/18

A 61 P 16/18

A 61 P 16/18

A 61 P 16/18

A 61 P 16/18

A 61 P 16/18

A 61 P 16/18

A 61 P 16/18

A 61 P 16/18

A 61 P 16/18

A 61 P 16/18

C 12 N 1/21

C 12 P 5/10

C 12 P 21/02

C 12 Q 1/68

G 01 N 33/15

G 01 N 33/50

G 01 N 33/53

G 01 N 33/56

G 01 N 33/59

G 01 N 33/62

G 01 N 33/65

G 01 N 33/68

G 01 N 33/71

G 01 N 33/74

G 01 N 33/77

G 01 N 33/80

G 01 N 33/83

G 01 N 33/86

G 01 N 33/89

G 01 N 33/92

G 01 N 33/95

G 01 N 33/98

G 01 N 34/01

G 01 N 34/04

G 01 N 34/07

G 01 N 34/10

G 01 N 34/13

G 01 N 34/16

G 01 N 34/19

G 01 N 34/22

G 01 N 34/25

G 01 N 34/28

G 01 N 34/31

G 01 N 34/34

G 01 N 34/37

G 01 N 34/40

G 01 N 34/43

G 01 N 34/46

G 01 N 34/49

G 01 N 34/52

G 01 N 34/55

G 01 N 34/58

G 01 N 34/61

G 01 N 34/64

G 01 N 34/67

G 01 N 34/70

G 01 N 34/73

G 01 N 34/76

G 01 N 34/79

G 01 N 34/82

G 01 N 34/85

G 01 N 34/88

G 01 N 34/91

G 01 N 34/94

G 01 N 34/97

G 01 N 35/00

G 01 N 35/03

G 01 N 35/06

G 01 N 35/09

G 01 N 35/12

G 01 N 35/15

C 12 Q 1/68

G 01 N 33/15

G 01 N 33/50

G 01 N 33/53

G 01 N 33/56

G 01 N 33/59

G 01 N 33/62

G 01 N 33/65

G 01 N 33/68

G 01 N 33/71

G 01 N 33/74

G 01 N 33/77

G 01 N 33/80

G 01 N 33/83

G 01 N 33/86

G 01 N 33/89

G 01 N 33/92

G 01 N 33/95

G 01 N 33/98

G 01 N 34/01

G 01 N 34/04

G 01 N 34/07

G 01 N 34/10

G 01 N 34/13

G 01 N 34/16

G 01 N 34/19

G 01 N 34/22

G 01 N 34/25

G 01 N 34/28

G 01 N 34/31

G 01 N 34/34

G 01 N 34/37

G 01 N 34/40

G 01 N 34/43

G 01 N 34/46

G 01 N 34/49

G 01 N 34/52

G 01 N 34/55

G 01 N 34/58

G 01 N 34/61

G 01 N 34/64

G 01 N 34/67

G 01 N 34/70

G 01 N 34/73

G 01 N 34/76

G 01 N 34/79

G 01 N 34/82

G 01 N 34/85

G 01 N 34/88

G 01 N 34/91

G 01 N 34/94

G 01 N 34/97

G 01 N 35/00

G 01 N 35/03

G 01 N 35/06

G 01 N 35/09

G 01 N 35/12

G 01 N 35/15

G 01 N 35/18

G 01 N 35/21

G 01 N 35/24

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**